

**Wirt-Vektor-Beziehungen und genetische Heterogenität von
Borrelia burgdorferi sensu lato in Borreliose Naturherden**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena

von Dipl. Biologin Susanne Kipp
geboren am 07.07.1971 in
Arnstadt

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Dorn, Jena
2. Gutachter: Prof. Dr. Erika Kothe, Jena
3. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Süss, Jena

Datum der Disputation: 08.07.2008

| | |
|---|-------------|
| INHALTSVERZEICHNIS..... | I |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | IV |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | VI |
| TABELLENVERZEICHNIS | VIII |
| | |
| 1 EINLEITUNG..... | 1 |
| 2 LYME BORRELIOSE..... | 3 |
| 2.1 Der Erreger- <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. | 3 |
| 2.1.1 Taxonomie und Morphologie..... | 3 |
| 2.1.2 Genom, Antigenstruktur und Pathologie | 4 |
| 2.1.3 Differenzierung und Verbreitung von <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. | 7 |
| 2.2 Epidemiologie | 8 |
| 2.2.1 Der Vektor- <i>Ixodes ricinus</i> | 8 |
| 2.2.1.1 Lebenszyklus, Taxonomie, Anatomie und Wirtsbefall | 8 |
| 2.2.1.2 <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. im Vektor..... | 12 |
| 2.2.1.3 Verbreitung von <i>Ixodes ricinus</i> und Durchseuchung mit <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. | 13 |
| 2.2.2 Erregerreservoir..... | 16 |
| 2.2.2.1 <i>Borrelia burgdorferi</i> im Reservoir | 16 |
| 2.2.2.2 Kleinsäuger als Reservoir | 18 |
| 2.2.2.3 Vögel als Reservoir..... | 20 |
| 2.2.2.4 Andere Reservoirtiere | 21 |
| 2.2.3 Nachweis von <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. in epidemiologischen Studien..... | 21 |
| | |
| 3 MATERIAL UND METHODEN | 23 |
| 3.1 Aufgabenstellung | 23 |
| 3.2 Geräte, Arbeitsmittel und Chemikalien | 24 |
| 3.2.1 Geräte | 24 |
| 3.2.2 Arbeitsmittel..... | 25 |
| 3.2.3 Chemikalien | 25 |
| 3.3 Probenmaterial | 26 |
| 3.3.1 Bakterienkulturen..... | 26 |
| 3.3.2 Nüchterne Zecken | 28 |
| 3.3.3 Kleinsäuger..... | 29 |
| 3.3.3.1 Untersuchungsgebiet..... | 29 |
| 3.3.3.2 Fang und Probenentnahme | 30 |
| 3.3.4 Vögel | 30 |
| 3.3.4.1 Untersuchungsgebiete | 30 |
| 3.3.4.2 Fang und Zeckenentnahme | 31 |

| | | |
|--------|--|-----------|
| 3.3.5 | Patientenzecken | 32 |
| 3.4 | Mikrobiologische Methoden | 32 |
| 3.4.1 | Kultivierung | 32 |
| 3.4.2 | Dunkelfeldmikroskopie | 32 |
| 3.4.3 | Zellzahlbestimmung von Bakterienkulturen | 33 |
| 3.5 | Indirekter Immunofluoreszenstest (IIFT) | 33 |
| 3.5.1 | Probenvorbereitung | 33 |
| 3.5.2 | Durchführung des IIFT | 34 |
| 3.6 | Untersuchung der Mäuseseren im IFAT | 34 |
| 3.7 | Präparation der DNA | 35 |
| 3.7.1 | DNA Extraktion aus Borrelienkulturen | 35 |
| 3.7.2 | DNA-Extraktion aus nüchternen Zecken | 35 |
| 3.7.3 | DNA-Extraktion aus gesogenen Zecken –Validierung der DNA-Extraktion | 36 |
| 3.7.4 | DNA-Extraktion aus Biopsiematerial | 36 |
| 3.7.5 | Quantifizierung der Borrelien | 36 |
| 3.7.6 | Erregernachweis mittels PCR-RFLP | 36 |
| 3.7.7 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der 5S-23S rRNA Region | 37 |
| 3.7.8 | Polymerase-Kettenreaktion des <i>OspA</i> -Gens | 38 |
| 3.7.9 | Agarosegelelektrophorese | 40 |
| 3.7.10 | Restriktionsanalyse der Amplifikate | 40 |
| 3.7.11 | Detektion und Analyse der Fragmentstücke | 41 |
| 3.8 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese | 43 |
| 3.8.1 | Proteinbestimmung nach Bradford | 43 |
| 3.8.2 | Acrylamidgelelektrophorese | 43 |
| 3.8.3 | Detektion und Analyse der Proteine | 44 |
| 3.8.4 | Sequenzanalyse | 45 |
| 3.8.5 | Sequenzierung des <i>OspA</i> -Gens | 45 |
| 3.8.6 | Phylogenetische Analyse | 46 |
| 3.8.7 | Statistik | 47 |
| 4 | ERGEBNISSE | 48 |
| 4.1 | Charakterisierung von <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l.-Isolaten | 48 |
| 4.1.1 | Spezies-Differenzierung und <i>OspA</i> -Subtypisierung | 48 |
| 4.1.2 | Sequenzanalyse | 50 |
| 4.2 | Prävalenzuntersuchung und genotypische Charakterisierung in freilandgefangenen Zecken | 53 |
| 4.2.1 | Untersuchung der Saisonalität von Prävalenz und Genospezies von <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. in Bad Berka 2001 und 2004 | 53 |

| | | |
|---------|---|-------------|
| 4.2.2 | Untersuchung an freilandgefangenen Zecken in Thüringen (Prävalenzstudie für das Thüringer Ministerium für Familie, Soziales und Gesundheit)..... | 56 |
| 4.2.2.1 | Dichte von <i>Ixodes ricinus</i> und Prävalenz von <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. | 56 |
| 4.2.2.2 | Spezies-Differenzierung und OspA-Subtypisierung | 58 |
| 4.2.2.3 | Mischinfektionen | 58 |
| 4.2.2.4 | Borrelien-Infektion in Abhängigkeit von der geografischen Lage..... | 59 |
| 4.3 | Untersuchung der Kleinsäuger..... | 63 |
| 4.3.1 | Fangdaten und Infestation mit <i>Ixodes ricinus</i> | 63 |
| 4.3.2 | Etablierung und Optimierung der DNA-Extraktion | 64 |
| 4.3.3 | PCR-RFLP der Mäuseproben und gesogenen Zecken | 66 |
| 4.3.4 | Untersuchung der Seren mittels IFAT | 66 |
| 4.4 | Untersuchung der Vögel | 67 |
| 4.4.1 | Fangdaten und Infestation mit <i>Ixodes ricinus</i> | 68 |
| 4.4.2 | Durchseuchung der gesogenen Zecken mit <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. | 69 |
| 4.4.2.1 | Borrelien-Infektion in Abhängigkeit von der Art | 71 |
| 4.4.2.2 | Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Fangort und der Zeit..... | 72 |
| 4.4.3 | Spezies-Differenzierung und OspA-Subtypisierung | 73 |
| 4.4.3.1 | Spezies und Subspezies in Abhängigkeit vom Fangort..... | 74 |
| 4.4.3.2 | Spezies und Subspezies in Abhängigkeit von der Art | 74 |
| 4.5 | Infektionen des Menschen mit Lyme Borreliose und Korrelation klinischer Symptome mit dem Erregerspektrum in nüchternen und gesogenen Zecken | 76 |
| 4.5.1 | Lyme Borreliose Erkrankungen in Thüringen | 76 |
| 4.5.2 | Vergleich der Krankheitsfälle mit den Prävalenzdaten in freilandgefangenen Zecken... | 77 |
| 4.5.3 | Untersuchung vom Menschen abgesammelter Zecken..... | 77 |
| 5 | DISKUSSION | 80 |
| 5.1 | Charakterisierung der <i>Borrelia burgdorferi</i> Kulturen | 80 |
| 5.2 | Untersuchung der nüchternen Zecken auf <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l..... | 82 |
| 5.2.1 | Genospezies und OspA-Typenverteilung in verschiedenen Regionen Thüringens | 82 |
| 5.2.2 | Untersuchung zur Saisonalität der Prävalenz und Genospezies in Bad Berka..... | 85 |
| 5.3 | Korrelation von Patientendaten mit den Durchseuchungsraten von <i>Ixodes ricinus</i> in freilandgefangenen und vom Menschen abgesammelten Zecken..... | 88 |
| 5.4 | Untersuchungen zur Durchseuchung der Kleinsäuger mit <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. | 91 |
| 5.5 | Untersuchungen zur Durchseuchung der Vögel mit <i>Borrelia burgdorferi</i> s. l. | 94 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG | 99 |
| | SUMMARY | XIII |
| | LITERATURVERZEICHNIS | XV |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|---------------|---|
| α | Signifikanzniveau |
| A. | <i>Apodemus</i> |
| Abb. | Abbildung |
| ACA | Acrodermatitis chronica atrophicans |
| ad | auf |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| aqua bidest. | aqua bidestillata |
| B. | <i>Borrelia</i> |
| afz | <i>afzelii</i> |
| ga | <i>garinii</i> |
| sl | <i>sensu lato</i> |
| ss | sensu stricto |
| val | <i>valaisiana</i> |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| BSA | Rinderserum-albumin |
| BSK-H | Barbour-Stoenner-Kelly-Medium |
| bp | Basenpaare |
| CRASP | complement regulatory acquiring protein |
| CSF | Cerebrospinalflüssigkeit |
| Dbp | decorin-binding-protein |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ELGA | enzyme-labelled protein G assay |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| EM | Erythema migrans |
| <i>et al.</i> | und andere |
| FITC | Fluorescein |
| <i>Fl</i> | Flagellin |
| <i>I.</i> | <i>Ixodes</i> |
| IFT | Immunofluoreszenstest |
| IgG | Immunglobulin G |
| IIFT | indirekter Immunofluoreszenstest |
| Kap. | Kapitel |

| | |
|------------|---|
| kb | Kilobasenpaare |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| M | Marker |
| <i>M.</i> | <i>Myodes</i> |
| Mb | Megabasenpaare |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| Ny | Nymphen |
| Osp | outer surface protein |
| p | Wahrscheinlichkeit |
| PBS | phosphatgepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerase – Kettenreaktion) |
| RFLP | Restriction fragment length polymorphism (Restriktionsfragmentlängen Polymorphismus) |
| RKI | Robert-Koch-Institut |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Tab. | Tabelle |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TE | Tris-EDTA |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Unit |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolette Strahlung |
| VisE | variable major protein |
| vs. | versus |
| W | Weibchen |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------------------|--|----|
| ABBILDUNG 2.1 | Erreger der Lyme Borreliose | 3 |
| ABBILDUNG 2.2 | Weltweite Verbreitung der Genospezies von <i>B. burgdorferi</i> s. l. | 8 |
| ABBILDUNG 2.3 | Verteilung der <i>B. burgdorferi</i> OspA-Serotypen 1-7 in Isolaten aus unterschiedlichem biologischem Material | 9 |
| ABBILDUNG 2.4 | Lebenszyklus von <i>I. ricinus</i> | 11 |
| ABBILDUNG 2.5 | Saugende Zecke | 12 |
| ABBILDUNG 2.6 | Mit Zecken infestierter Vogel | 20 |
| ABBILDUNG 3.1 | Fangorte der Zecken, Vögel und Kleinsäuger | 28 |
| ABBILDUNG 3.2 | Fangebiet der Kleinsäuger in Bad Berka | 29 |
| ABBILDUNG 3.3 | Untersuchungsgebiet Reifenstein | 31 |
| ABBILDUNG 3.4 | Untersuchungsgebiet Hütscheroda | 31 |
| ABBILDUNG 3.5 | Untersuchungsgebiet Steinberg bei Zimmern | 31 |
| ABBILDUNG 3.6 | Zeckenentnahme bei einem Rotkehlchen | 31 |
| ABBILDUNG 3.7 | Schematische Darstellung des Verlaufs der PCR der 5S-23S rRNA Region..... | 38 |
| ABBILDUNG 3.8 | Schematische Darstellung des Verlaufs der PCR des <i>OspA</i> -Gens | 39 |
| ABBILDUNG 3.9 | Restriktionsmuster der verschiedenen OspA-Serotypen | 42 |
| ABBILDUNG 3.10 | Schematische Darstellung der Sequenzreaktion des <i>OspA</i> -Gens | 46 |
| ABBILDUNG 4.1 | Beispiel der PCR-RFLP des <i>OspA</i> -Gens | 48 |
| ABBILDUNG 4.2 | Verteilung der <i>B. burgdorferi</i> Genospezies und OspA-Serotypen in Thüringer Isolaten nach PCR-RFLP | 49 |
| ABBILDUNG 4.3 | Verteilung der Genospezies und der OspA-Serotypen der Isolate aus Bad Berka, Weimar und Dienstedt | 49 |
| ABBILDUNG 4.4 | Unbekannte Restriktionsmuster a-d der <i>B. burgdorferi</i> s. l. Isolate | 50 |
| ABBILDUNG 4.5 | Distanz-Matrix-Dendrogramm des <i>OspA</i> -Gens von <i>B. burgdorferi</i> s. l. | 51 |
| ABBILDUNG 4.6 | Saisonale Darstellung der Prävalenz von <i>B. burgdorferi</i> s. l. der einzelnen Entwicklungsstadien von <i>I. ricinus</i> | 54 |
| ABBILDUNG 4.7 | a) Restriktionsmuster der Zecke B241 b) Restriktionsmuster der Mischinfektionen der Zecken B225 und B318 | 55 |
| ABBILDUNG 4.8 | Saisonale Verteilung der Genospezies und vorkommenden OspA- Serotypen in Bad Berka 2001 und 2004..... | 56 |
| ABBILDUNG 4.9 | Dichte von <i>I. ricinus</i> in Thüringen | 57 |
| ABBILDUNG 4.10 | Verteilung der Genospezies von <i>B. burgdorferi</i> s. l. und OspA- Serotypen von <i>B. garinii</i> in allen Gebieten in Thüringen | 58 |

| | | |
|-----------------------|---|----|
| ABBILDUNG 4.11 | Mischinfektionen in <i>B. burgdorferi</i> positiven Zecken a) Anteil der Misch-infektionen b) Anteil der Kombinationen an den Mischinfektionen | 59 |
| ABBILDUNG 4.12 | Verteilung der Prävalenz von <i>B. burgdorferi</i> s. l. der einzelnen Entwicklungsstadien von <i>I. ricinus</i> in den Pools in Thüringen | 60 |
| ABBILDUNG 4.13 | Karte von Thüringen und Verteilung der Genospezies von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in den Pools | 61 |
| ABBILDUNG 4.14 | Verteilung der OspA-Serotypen von <i>B. garinii</i> in den Pools in Thüringen | 62 |
| ABBILDUNG 4.15 | Verteilung der Genospezies von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in den Pools unterteilt nach den Entwicklungsstadien von <i>I. ricinus</i> | 62 |
| ABBILDUNG 4.16 | Saisonale Fangdaten der Kleinsäuger in den Jahren 2001, 2002 und 2004 | 63 |
| ABBILDUNG 4.17 | Infestationsraten der Kleinsäuger mit a) Larven und b) Nymphen in den Jahren 2001, 2002 und 2004 | 64 |
| ABBILDUNG 4.18 | Validierung des SIGMA Gen Elute™ Bacterial Genomic DNA Kits | 65 |
| ABBILDUNG 4.19 | Darstellung der Anteile von Kleinsäufern mit positiven Larven | 65 |
| ABBILDUNG 4.20 | Anteile der Kleinsäuger mit positivem Antikörpertiter gegen <i>B. burgdorferi</i> s. l. in den Jahren 2001, 2002 und 2004 | 66 |
| ABBILDUNG 4.21 | Saisonale Darstellung positiver Kleinsäuger in den Jahren 2001, 2002 und 2004 | 67 |
| ABBILDUNG 4.22 | Zusammenhang zwischen den Infestationsraten und den Titern der Kleinsäuger | 67 |
| ABBILDUNG 4.23 | Infestationsraten a) der Larven und b) der Nymphen von Amsel, Rotkehlchen und Singdrossel in den Jahren 2004 und 2005 im Frühjahr und Sommer | 69 |
| ABBILDUNG 4.24 | Darstellung eines Beispiels für die Untersuchung der Vogelzecken mittels a) OspA PCR und b) anschließender RFLP | 70 |
| ABBILDUNG 4.25 | a) Borrelienprävalenz in den abgesammelten Zecken unterschiedlicher Vogelarten 2004/2005 b) Darstellung der Anteile von Vögeln mit positiven und negativen Zecken | 71 |
| ABBILDUNG 4.26 | Darstellung der Borrelien-Prävalenz der einzelnen Entwicklungsstadien von Vögeln abgesammelter Zecken in den Untersuchungsgebieten der Jahre 2004 und 2005 | 72 |
| ABBILDUNG 4.27 | Darstellung der Infestationsraten und Borrelien-Prävalenz von Amseln in den Untersuchungsgebieten in den Jahren 2004 und 2005 | 72 |

| | | |
|-----------------------|---|----|
| ABBILDUNG 4.28 | Saisonale Darstellung der Infestation/Vogel und Borrelien-Prävalenz von Amseln und Singdrosseln | 73 |
| ABBILDUNG 4.29 | Genospezies von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in von Amseln und Singdrosseln abgesammelten Larven und Nymphen | 75 |
| ABBILDUNG 4.30 | Saisonale Verteilung der Borreliose-Erkrankungen in den Jahren 2003 und 2004 | 76 |
| ABBILDUNG 4.31 | Verteilung der Borreliose-Erkrankungen nach dem Alter der Patienten .. | 76 |
| ABBILDUNG 4.32 | Prävalenz von <i>B. afzelii</i> in freilandgefangenen Zecken und Anteile der Erkrankungsfälle in den einzelnen Pools in Thüringen | 77 |
| ABBILDUNG 4.33 | Vom Menschen abgesammelte <i>I. ricinus</i> Zecken | 78 |
| ABBILDUNG 4.34 | Saisonale Verteilung der Zeckenentnahme vom Menschen und Prävalenz von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in Thüringen | 78 |
| ABBILDUNG 4.35 | Verteilung der Genospezies von <i>B. burgdorferi</i> s. l. und OspA-Serotypen von <i>B. garinii</i> in vom Menschen abgesammelten Zecken aus Thüringen | 79 |
| ABBILDUNG 4.36 | Verteilung der Genospezies in freilandgefangenen und vom Menschen abgesammelten Zecken des Saale-Ilmtals | 79 |
| ABBILDUNG 5.1 | Vergleich der Prävalenzen von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in Nymphen und Adulten in verschiedenen Jahren in Bad Berka | 86 |
| ABBILDUNG 5.2 | Saisonale Prävalenz von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in Bad Berka (1996-2001, 2004) a) Weibchen b) Nymphen | 86 |
| ABBILDUNG 5.3 | Infestationsraten der Kleinsäuger in den Jahren 2001, 2002 und 2004 .. | 91 |
| ABBILDUNG 5.4 | Zusammenhang zwischen a) Infestation mit Nymphen und b) Prävalenz der positiven Titer bei <i>M. glareolus</i> in den Jahren 2001, 2002 und 2004 | 93 |
| ABBILDUNG 5.5 | Vergleich der <i>B. burgdorferi</i> s. l.-Prävalenz in von Vögeln abgesammelten und freilandgefangenen Zecken | 98 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|--------------------|---|----|
| TABELLE 2.1 | Prävalenzen von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in Europa | 16 |
| TABELLE 2.2 | Resistenzen von <i>B. burgdorferi</i> s. l. Genospezies gegenüber dem Komplement verschiedener Wirte | 18 |
| TABELLE 3.1 | Borrelien-Isolate aus den Habitaten Bad Berka, Belvedere, Dienststedt, Thüringen | 26 |
| TABELLE 3.2 | Referenzstämme | 28 |
| TABELLE 3.3 | Primer für die Amplifikation der 5S-23S rRNA Region | 37 |
| TABELLE 3.4 | Primer für die nested PCR des OspA Gens von <i>B. burgdorferi</i> s. l. | 39 |
| TABELLE 3.5 | Schnittstellen und Temperaturoptimum der Restriktionsenzyme | 41 |
| TABELLE 3.6 | Theoretische Fragmentgrößen der Restriktion des <i>OspA</i> -Gens nach Michel et al., 2003 | 42 |
| TABELLE 3.7 | Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels | 44 |
| TABELLE 4.1 | Theoretische Fragmentgrößen der Restriktion des <i>OspA</i> -Gens Isolate mit unbekanntem Restriktionsmuster | 52 |
| TABELLE 4.2 | Verteilung der Genospezies und OspA-Serotypen von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in den Isolaten aus Bad Berka, Weimar und Dienststedt nach PCR-RFLP und Sequenzierung | 53 |
| TABELLE 4.3 | Saisonale Prävalenzdaten in Bad Berka der Jahre 2001 und 2004 | 54 |
| TABELLE 4.4 | Verteilung der Genospezies und OspA-Serotypen von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in Zecken aus Bad Berka | 55 |
| TABELLE 4.5 | Ergebnisse der Prävalenzuntersuchung mittels PCR und IFT | 57 |
| TABELLE 4.6 | Verteilung der Genospezies und OspA-Serotypen von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in den Pools in Thüringen | 60 |
| TABELLE 4.7 | Signifikanzergebnisse für die Unterschiede in den Anteilen der Genospezies von <i>B. burgdorferi</i> s. l. der unterschiedlichen Gebiete | 61 |
| TABELLE 4.8 | Fangdaten der Vögel in Reifenstein, Hütscheroda und Steinberg 2004/2005 | 68 |
| TABELLE 4.9 | Verteilung der Genospezies und OspA-Serotypen von <i>B. burgdorferi</i> s. l. in von Vögeln abgesammelten Zecken | 74 |

1 EINLEITUNG

Die häufigste von Vektoren übertragene Krankheit in Europa und Nordamerika ist die Lyme Borreliose, bei der man für Deutschland auf Grundlage regional epidemiologischer Studien jährlich von 50.000-80.000 Neuerkrankungen ausgehen kann (Huppertz et al., 1999). Aufgrund der fehlenden Meldepflicht, in den neuen Bundesländern besteht lediglich eine freiwillige Meldepflicht, existieren keine exakten Daten zur Prävalenz und Inzidenz dieser Krankheit (Mehnert & Krause, 2005). Die Lyme Borreliose ist eine Multisystemerkrankung mit möglicher Beteiligung von Haut, Nervensystem, Herz, Gelenksystem und Auge und zeigt einen stadienhaften Verlauf. Anhand von Studien kann man davon ausgehen, dass 1-3 % der Zeckenstiche in Endemiegebieten zu einer Infektion führen (Maiwald et al. 1998; Nahimana et al., 2004).

Erste Symptome dieser Krankheit wurden in Europa schon 1883 beobachtet (Buchwald 1883). Neurologische Symptome beschrieb 1941 der Münchner Banwarth. Aber erst Untersuchungen nach einem vermehrten Auftreten von Arthritis nach Zeckenstichen in der Stadt Lyme (Connecticut, USA) charakterisierten eine Spirochäte, später *B. burgdorferi* sensu lato (s. l.) genannt, als Verursacher dieser Krankheit (Burgdorfer et al., 1982). Der Erreger konnte auch aus der in Europa vorkommenden Zeckenart *I. ricinus* isoliert werden (Burgdorfer et al., 1983). Anhand neuer Diagnoseverfahren können immer mehr undiagnostizierte Symptome dieser Krankheit zugeordnet werden. So komplex wie die Krankheit selbst ist auch der Lebenszyklus ihres Erregers *B. burgdorferi* s. l., der geprägt ist durch die wechselseitigen Beziehungen von Vektoren und Wirten. Zwischen Erreger, Vektor und Reservoirwirt konnten sich im Laufe der Zeit unterschiedliche Beziehungen herausbilden, die zu verschiedenen Transmissionszyklen führten (Nuttall et al., 1999). Erschwert wird die Klärung der Wirt-Vektor-Beziehung durch die Unterteilung von *B. burgdorferi* s. l. in mehrere Genospezies, die in unterschiedliche Zyklen eingebunden sind. Viele Untersuchungen zeigen die Assoziation der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. mit unterschiedlichen Reservoirtieren (Hanincova et al., 2003, Humair et al., 1999; Kurtenbach et al., 1998; Kurtenbach et al., 2002).

Die Annahme der Verursacher der Lyme Borreliose sei ein einziger Erreger konnte seit der Entdeckung von *B. burgdorferi* anhand zahlreicher immunologischer und molekularbiologischer Untersuchungen widerlegt werden. Zurzeit wird der *B. burgdorferi* s. l. Komplex in 12 Genospezies eingeteilt (Baranton et al. 1992; Kawabata, Masuzawa und Yanagitara 1993; Wang et al. 1997; Le Fleche et al. 1997; Marconi und Garon 1992; Fukunaga et al. 1996; Postic et al. 1998; Wang et al., 1999) von denen vier (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii* und *B. garinii* und *B. spielmanii*) sicher pathogen sind und drei weitere (*B. valaisiana*, *B. lusitaniae* und *B. bissettii*) noch in der Diskussion stehen, da sie ebenfalls aus Patientenmaterial isoliert wurden (Collare-Pereira et al., Diza et al., 2004; Fingerle et al., 2007b; 2004; Strle et al., 2000;

Wang et al., 1999a). Eine Korrelation von *B. burgdorferi* s. l. Genospezies mit Krankheitsbildern konnte für *B. afzelii* und *B. garinii* nachgewiesen werden (Assous et al., 1993; Balmeli et al., 1995; Busch et al., 1996; van Dam et al., 1993; Wilske et al., 1996a; Ruzic-Sabljic et al., 2000; Eiffert et al., 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit war, unter Anwendung molekularbiologischer Techniken und anschließender phylogenetischer Untersuchungen, die Differenzierung von *B. burgdorferi* s. l. in Thüringen. Anhand dieser Ergebnisse sollte die derzeitige Genotypisierung der Borrelien für Thüringen überprüft und darüber hinaus untersucht werden, ob andere Genotypen als in bereits untersuchten Gebieten existieren. Weiterhin stellte sich die Frage, inwiefern die Prävalenz und vorhandenen Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. mit der geographischen Verteilung und mit Daten von Krankheitsfällen in Thüringen korrelieren. Außerdem sollte geklärt werden, welche Rolle Vögel und Kleinsäuger in den untersuchten Gebieten bei der Verbreitung der unterschiedlichen Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. spielen.

2 LYME BORRELIOSE

2.1 Der Erreger- *Borrelia burgdorferi*

2.1.1 Taxonomie und Morphologie

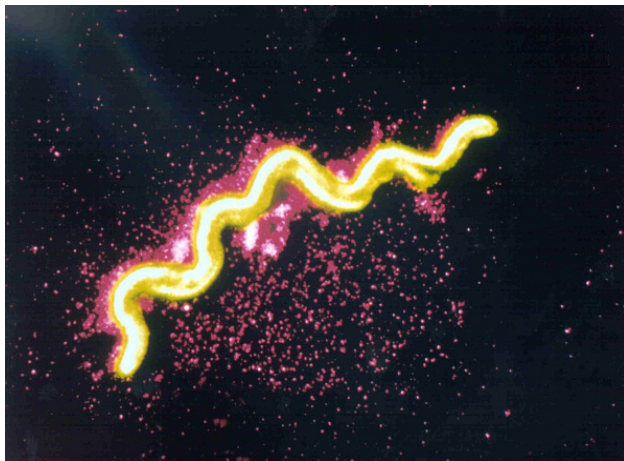


Abb. 2.1 Erreger der Lyme Borreliose

(www.zecken.de)

Beim Erreger der Lyme Borreliose handelt es sich um microaerophile, gram-negative, schraubenförmige Spirochäten mit einer Länge von 8-22µm und einer Breite von 0,25-0,3 µm (Abb. 2.1). Taxonomisch gehört *B. burgdorferi* zur Ordnung der Spirochaetales und zur Familie der Spirochaetaceae (Burgdorfer et al., 1982). Neben der Gattung *Borrelia* gehören noch vier weitere zu dieser Familie z.B. die Treponemen zu denen der Erreger der Syphilis *Treponema pallidum*

gehört. Die Gattung *Borrelia* spaltet sich in zwei phylogenetische Gruppen auf: die Erreger des Rückfallfiebers und die Erreger der Lyme Borreliose, die zum *B. burgdorferi* sensu lato-Komplex zusammengefasst werden. Zu diesem Komplex gehören auch die nicht pathogenen *B. burgdorferi* Arten (Wang et al., 1999b). Wie bei allen Mitgliedern der Gattung *Borrelia* ist auch der Lebenszyklus von *B. burgdorferi* obligat parasitisch und zirkuliert in Transmissionszyklen.

Die Annahme, dass es sich um einen einheitlichen Stamm handelt (Burgdorfer et al., 1982; Dykhuizen et al., 1993) konnte nicht lange bestehen. Die infektiobiologische Erforschung von *B. burgdorferi* s. l. hat seit der Entdeckung des Erregers 1982 durch W. Burgdorfer, im Hinblick auf den komplexen Infektionszyklus und der genetischen Heterogenität des Erregers große Fortschritte gemacht. Bei dem heute als *B. burgdorferi* s. l. bezeichneten Erregerkomplex (Baranton et al., 1992) handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe, bei der bislang basierend auf verschiedenen phenotypischen und genotypischen Untersuchungen, auf die später noch näher eingegangen wird, 12 Genospezies unterschieden werden können. Diese sind *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii* (Baranton et al. 1992), *B. japonica* (Kawabata et al., 1993), *B. valaisiana* (Wang et al. 1997), *B. lusitaniae* (Le Fleche et al. 1997), *B. andersonii* (Marconi und Garon 1992), *B. tanukii*, *B. turdi* (Fukunaga et al. 1996), *B. bissettii* (Postic et al. 1998), *B. sinica* (Masuzawa et al., 2001) und *B. spielmanii* (Rijpkema et al., 1999). Von diesen sind *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. valaisiana*, *B. spielmanii*, *B. lusitaniae* und *B. bissettii* in Europa nachgewiesen (Hubalek u. Halouzka 2003, Rauter und

Hartung, 2005), wobei das humanpathogene Potential nur von den ersten vier Genospezies sicher bekannt ist (Busch et al. 1996, Fingerle et al., 2007, Lebech et al., 1998, Liveris et al. 1999, Strle et al. 1997, van Dam et al. 1997, Wilske et al. 1996a). Die Rolle von *B. bissettii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* ist noch unklar, obwohl alle in klinischem Material nachgewiesen werden konnten (Fingerle et al., 2007, Michel et al., 2003, Picken et al. 1996, Strle et al. 1997, Rijpkema et al. 1997, Ryffel et al., 1999, Wang et al., 1999a).

Die Außenhülle von *B. burgdorferi* s. l. besteht wie bei allen gramnegativen Bakterien aus einer Cytoplasmamembran im Inneren, die das Protoplasma umhüllt. An sie schließt sich nach außen die komplexere äußere Membran an. Hier eingelagert sind Lipoproteine und Glycolipide. Die sonst üblichen Lipopolysaccharide (LPS) fehlen vollständig. Die Lipoproteine auch „outer surface proteins“ genannt, führen aber genau wie die LPS zu einer Entzündungsreaktion (Salyers and Witt, 2002). Zwischen der äußeren und inneren Membran sitzen, eng um den Zellkörper gewunden, sieben bis elf Endoflagellen, welche die typische korkenzieherartige Bewegung bewirken (Horst, 2003). Auch seitliche Bewegungen können sie ausführen, da sie in ihrer Längsachse biegsam sind (Horst, 2003).

2.1.2 Genom, Antigenstruktur und Pathologie

Genom

Das Genom von *B. burgdorferi* s. l. konnte bereits vollständig sequenziert werden. Es handelt sich um ein lineares Chromosom mit einer Länge von etwa 950 kb und zusätzliche um mehrere lineare und zirkuläre Plasmide (Fraser et al, 1997). Verglichen mit anderen Prokaryoten besitzt *B. burgdorferi* s. l. eine der komplexesten genomischen Strukturen (Porcella und Schwan, 2001). Mit diesem linearen Chromosom unterscheiden sich Borrelien von den eng verwandten Leptospiren und Treponemen, welche ein zirkuläres Chromosom haben. Die 853 Gene des Chromosoms kodieren für Proteine der DNA-Replikation, -Transkription, -Translation, Stoffwechseltransport und Energiemetabolismus. Die Plasmide teilen sich auf in 12 lineare und 9 zirkuläre (Casjens et al., 2000). Auf den Plasmiden liegen unter anderem Gene für die Proteine, die in die Interaktion mit dem Wirt eingebunden sind, wie die Lipoproteine z. B. die Oberflächenproteine OspA und OspC. Mit einem Anteil von 14,5% von codierenden Sequenzen der Plasmide die für Lipoproteine codieren, nimmt der *B. burgdorferi* s. l. Komplex eine Sonderstellung unter den Bakterien ein (Casjens et al., 2000, Fraser et al., 1997). Ein Entfernen der Plasmide und damit der Gensequenzen der Lipoproteine führt zu einer verminderten Infektiosität (Lawrenz et al., 2004, Xu et al., 1996).

Antigenstruktur

Während des Infektionszyklus muss der Erreger mit dem Vektor und verschiedenen Wirten interagieren. Um übertragen werden zu können, müssen die Erreger lange genug im Wirt persistieren und dessen Immunsystem widerstehen. Dieses meistert *B. burgdorferi* s. l., wie auch andere Erreger, mit der Veränderung seiner Oberflächenproteine. Diese Lipoproteine, die der Zellwand aufgelagert sind, sorgen für eine Interaktion zwischen Bakterien und Wirtszelle (Fingerle et al., 1995; Fingerle et al., 2000; Schwan et al., 2003). So werden eine Vielzahl dieser Lipoproteine nur in einer bestimmten Phase des Lebenszyklus exprimiert (Anguita et al., 2003, Fingerle et al., 2002, Lawrenz et al., 2004, Liang et al., 2004, Ohnishi et al., 2003, Pal et al., 2004). Das am besten untersuchte Oberflächenprotein ist das OspA, welches, im Darm nüchterner Zecken exprimiert, der Anhaftung der Bakterien im Vektor dient (Fingerle et al., 1995; Pal et al., 2000). Das Gene für dieses Protein liegt gemeinsam mit dem für das OspB auf einem linearen Plasmid (Casjens et al., 2000). Aufgrund der Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern und den Sequenzdaten des *OspA* Gens, welches sehr heterogen ist, konnten sieben OspA Serotypen innerhalb der pathogenen Arten unterschieden werden. *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. afzelii* entsprechen den OspA Serotypen 1 und 2. *B. garinii* dessen OspA sehr heterogen ist, kann in fünf Serotypen eingeteilt werden (OspA Serotyp 3-7) (Will et al., 1995, Wilske et al., 1993). Später kam noch ein weiterer Serotyp 8 (*B. garinii*) dazu. (Wilske et al., 1996b). Diese Einteilung konnte auch auf genetischer Ebene bestätigt werden (Will et al., 1995). Ein ebenfalls wichtiges Lipoprotein ist das OspC, das während der Blutmahlzeit gebildet wird (Fingerle et al., 2002, Pal et al., 2004). Es zeigt eine noch größere Heterogenität, was auf eine wichtige Rolle in der Interaktion mit den unterschiedlichen Reservoirwirten hindeutet (Jauris-Heipke et al., 1995; Masuzawa et al., 1996). Bislang konnten 22 OspC-Serotypen identifiziert werden (Brisson et al., 2004), wobei vier große Hauptgruppen jeweils in vier verschiedenen Wirtsgruppen gefunden wurden (Brisson und Dykhuizen, 2000). Phylogenetische und experimentelle Untersuchungen zeigten innerhalb des *OspC*-Gens eine hohe Rekombinationsrate. Man geht von einem horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Stämmen aus (Jauris-Heipke et al., 1995; Stevenson et al., 1998b; Wang et al., 1999). Weitere Oberflächenproteine sind das OspD und OspF, welche eine für die Infektion und Transmission unbedeutende Rolle spielen. So konnte in Tierversuchen bei Verlust des OspD kein Einfluss der Infektion von Kleinsäugetern festgestellt werden (Hovis et al., 2006; Li et al., 2007). In letzter Zeit immer mehr in den Blickpunkt der Forschung geraten sind die so genannten CRASPs (complement regulatory acquiring proteins), zu denen auch das OspE gehört (Kraiczy et al 2001a, b). Diese Proteine werden während der Infektion im Wirt exprimiert und interagieren mit den Komplement-Kontrollproteinen, was zu einer Komplementresistenz führen kann (Hovis et al., 2006). Ähnlich dem OspC scheint die Expression temperaturabhängig zu sein (Salyers and Whitt, 2002; Stevenson et al., 1998a). Es können

zurzeit fünf dieser CRASPs unterschieden werden, deren Vielgestaltigkeit ebenso wie beim OspC eine Bedeutung bei der Übertragung auf eine Vielzahl möglicher Reservoirwirte haben könnte. Zwei weitere, beim Infektionsprozess wichtige, Gruppen von Oberflächenproteinen sind die Dbps (Decorin-binding-proteins) und die VlsE (variable major protein). Beim VlsE, dessen Synthese ebenfalls während des Wirt-Zecke-Infektionszyklus reguliert wird, findet die Aktivierung beim Übergang in den Wirt statt. (Salyers an Whitt, 2002; Fischer et al., 2003; Liang et al., 2004). Untersuchungen zeigten auch eine unterschiedlich starke Expression in verschiedenen Gewebetypen (Bykowski et al., 2006). Die Rolle dieses Lipoproteins konnte an Mäusen beobachtet werden, die mit *B. burgdorferi* s. l. infiziert wurden denen das entsprechende Plasmid fehlte. Es zeigte sich in einer deutlich reduzierten Infektiösität (Lawrenz et al., 2004). DbpA und DbpB gehören zu den Liganden-bindenden Proteinen. Durch sie wird während der entzündungsbedingten Angiogenese von Wirtsendothelzellen gebildetes Decorin gebunden und so die humorale Abwehr umgangen. Auch für das DbpA konnte ein hoher Grad an Gentransfer beobachtet werden. In Europa können fünf verschiedene Gruppen an DbpAs unterschieden werden (Schulte-Spechtel et al., 2006).

Einige dieser Lipoproteine sind aufgrund ihrer Bedeutung im Infektionsprozess Kandidaten für einen Impfstoff, an dem für Europa zurzeit noch geforscht wird. Im Gespräch ist hier ein OspA Impfstoff (Wilske et al., 1996a). Die OspA-Antikörper des geimpften Wirtes töten die Borrelien zu Beginn des Saugaktes bereits im Darm der Zecke ab (Fikrig et al., 1990; Fikrig et al., 1992; Thanassi et al., 2000). Auch eine Impfung mit rekombinanten OspC ist möglich (Earnhart et al., 2007, Wilske et al., 1996a). Hier erfolgt die Abtötung des Erregers teils in der Zecke und teils erst im Wirt. Ein tetravalenter OspC Impfstoff konnte erfolgreich an Mäusen getestet werden (Earnhart et al., 2007). Aufgrund der großen Heterogenität auf OspA und OspC Ebene ist für Europa eine Mehrfach-Vakzine erforderlich, da eine Einzel-Vakzine gegen andere Genospezies nicht wirksam ist (Fikrig et al., 1992; Lovrich et al., 1994) Hierfür sind genaue Kenntnisse über die Verteilung der Genospezies und Serotypen erforderlich. Seit neuestem wird auch über das DbpA als Impfstoffkandidat nachgedacht (Schulte-Spechtel et al., 2006).

Pathologie

Die Lyme Borreliose ist eine Multisystemerkrankung, deren Bedeutung erst in den letzten beiden Jahrzehnten deutlich wurde. Anhand neuer Nachweismethoden konnte in vielen Fällen mit unklarer Symptomatik *B. burgdorferi* s. l. als Verursacher ermittelt werden. Ähnlich wie bei der eng verwandten Syphilis nimmt die Erkrankung einen stadienhaften Verlauf. Man unterscheidet drei Stadien, die eingeteilt werden in Früh- und Spätstadien, wobei nicht alle dieser Stadien durchlaufen werden müssen. Sie können auch einzeln auftreten. (Steere, 1989). Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass einige dieser klinischen Manifestationsformen eng mit

bestimmten Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. korrelieren (Assous et al., 1993; Balmeli et al., 1995; Bennet et al., 2006; Busch et al., 1996; Carlson et al., 2003; Picken et al., 1998, Wilske et al., 1996a). Beim Frühstadium I kommt es nach der Übertragung des Erregers zu einer lokalen Infektion, dem Erythema migrans, welches fast ausschließlich durch *B. afzelii* (Serotyp 2) verursacht wird (Assous et al., 1993, Balmeli et al., 1995, Bennet et al., 2006, Carlson et al., 2003, Logar et al., 2004; Picken et al., 1998, Ruzic-Sabljic et al., 2000). Das Tage bis Wochen nach dem Stich auftretende Erythem ist das Leitsymptom der Erkrankung und in weiten Teilen Europas das am häufigsten zu beobachtende Symptom (Carlson et al., 2003, Maiwald et al., 1998, Mehnert & Krause, 2005, Priem et al., 2003). Das liegt mit großer Wahrscheinlichkeit daran, dass 75% der *B. afzelii* Stämme zu den serumresistenten Borrelien gehören, was in Wachstumsuntersuchungen in Anwesenheit von menschlichem Serum gezeigt werden konnte (Breitner-Ruddock et al., 1997; Kraiczy et al., 2000; Kraiczy et al., 2002). Als Frühstadium II sind neurologische Funktionsstörungen, eine Neuroborreliose, möglich, die sehr häufig mit *B. garinii* vor allem dem OspA Serotyp 4 assoziiert ist (Eiffert et al., 1995; Lebech et al., 2002, Peter et al., 1997, Wilske et al., 1996). Aber auch die *B. garinii* OspA Serotypen 3, 5, 6 und 7, *B. afzelii* und *B. burgdorferi sensu stricto* konnten in der Cerebrospinalflüssigkeit von Neuroborreliose-Patienten nachgewiesen werden (Ornstein et al., 2002). Die Frühstadien dieser Erkrankung treten, der Aktivität des Vektors folgend, gehäuft in den Sommermonaten auf (Wilske et al., 1987, www.rki.de). Das charakteristische Bild des Spätstadiums III ist die Lyme-Arthritis, die in Europa seltener auftritt. Ein Zusammenhang zwischen *B. burgdorferi sensu stricto* und der Lyme Arthritis, der in Amerika gefunden wurde, konnten von Eiffert et al. (1998) und Vasiliu et al. (1998) für Europa nicht bestätigt werden. Lunemann et al. (2001) dagegen fanden in Proben von Patienten mit Lyme Arthritis fast ausschließlich *B. burgdorferi sensu stricto*. Häufiger als in Amerika tritt dagegen in Europa die Acrodermatitis chronica atrophicans (ACA) auf und auch hier konnte wie beim Erythema migrans hauptsächlich *B. afzelii* aus Biopsieproben isoliert werden (Busch et al., 1996, Lunemann et al., 2001; Ohlenbusch et al., 1996 Wilske et al., 1993).

Als Pathogenitätsfaktoren spielen die Oberflächenproteine und -lipoproteine eine wichtige Rolle. Man weiß z.B., dass OspA und OspB die Produktion von Interleukinen und TNF α durch die Anregung von Knochenmarksmakrophagen aktivieren können. (Honarvar et al., 1994, Shanafelt et al., 1992). Eine wesentliche Rolle im Infektionsprozess spielen die CRAS-Proteine. Bei serumresistenten Strängen erfolgt eine Expression dieser Proteine, welche durch Bindung an das menschliche FH-Protein und FH ähnliche Protein 1, eine Aktivierung des Komplementsystems verhindern und so zu einer Infektion führen.

2.1.3 Verbreitung von *Borrelia burgdorferi* s. l.

Endemische Gebiete der Lyme Borreliose findet man in Europa, den USA, Australien und Asien. Da der Erreger an das Vorkommen der Vektoren gebunden ist, deckt sich das Vorkommen der Lyme Borreliose mit der Verbreitung der Hauptvektoren, in Europa *I. ricinus* (Horst, 2003). Studien zur Durchseuchung der Zecken in Europa weisen gebietsabhängig auf eine Infektionsrate zwischen 10% und 30% bei Nymphen und Adulten hin (Hubalek & Halouzka, 2003; Rauter und Hartung, 2005).

In Nordamerika konnten bisher *B. burgdorferi* sensu stricto (Ryan et al., 2000), *B. andersonii* (Marconi et al., 1995) und *B. bisettii* (Postic et al., 1998, Schneider et al., 2000, Wang et al., 1999b) nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich kein Zusammenhang von *B. bisettii* mit einer Erkrankung beim Menschen, während in Europa *B. bisettii* aus Patientenmaterial isoliert werden konnte (Strle et al., 1997). Phylogenetische Untersuchungen von *B. burgdorferi* sensu stricto Strängen aus Amerika und Europa zeigten, dass *B. burgdorferi* sensu stricto in Amerika viel heterogener ist als in Europa, was dafür spricht, dass sich diese Spezies unabhängig in Amerika entwickelte und dann nach Europa eingeschleppt wurde (Wang et al., 1999b).

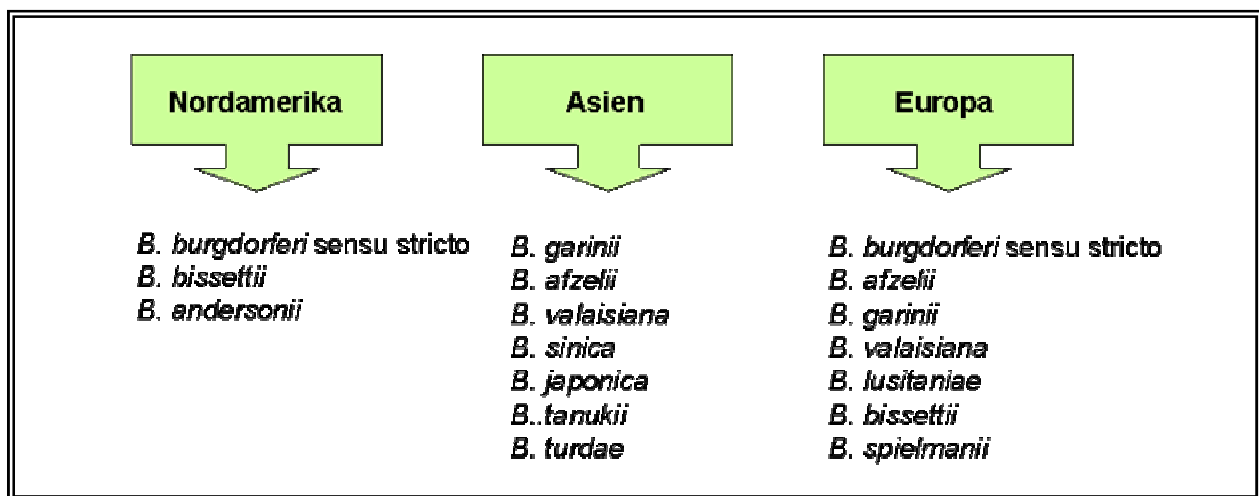


Abb. 2.2 Weltweite Verbreitung der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l.

In Europa kann eine Abnahme der Häufigkeit von *B. burgdorferi* sensu stricto nach Osten hin beobachtet werden (Hubalek et al., 1997). Die in Asien und Europa gleichermaßen vorkommende Genospezies *B. afzelii* ist stabil in ihrer Verbreitung. Weiterhin in Asien nachgewiesen wurden *B. garinii*, *B. sinica* und speziell in Japan *B. japonica*, *B. tanukii* und *B. turdae* (Fukunaga et al., 1995, Kawabata et al., 1993, Nakao & Miyamoto, 1994; Masuzawa et al., 2001). Auch *B. valaisiana* konnte in Japan gefunden werden (Masuzawa et al., 2004). In Europa wurden in Zecken oder Patientenmaterial *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. bisettii*, *B. valaisiana* und *B. spielmanii* nachgewiesen (Fingerle et al.,

2007, Kurtenbach et al., 2001, LeFleche et al., 1997, Lencakova et al., 2006, Michel et al., 2003, Rijpkema et al., 1997, Wang et al., 1997, Wang et al., 1999). Die weltweite Verbreitung von *B. burgdorferi* s. l. ist schematisch in Abbildung 2.2 dargestellt. Eine große Anzahl von Studien in ganz Europa (dargestellt in Tab. 2.1; S. 16) zeigen die Prävalenz und die Heterogenität von *B. burgdorferi* s. l. Das Vorkommen der einzelnen Genospezies und deren prozentualer Anteil variiert dabei stark zwischen den Ländern Europas sowie den einzelnen Regionen in Deutschland. Bei der in ihrem OspA sehr heterogenen Art *B. garinii* konnte anhand von Sequenzvergleichen eine Verbreitung über große Distanzen nachgewiesen werden, was an der Mobilität ihrer Reservoirwirte liegt (Gylfe et al., 2001, Kurtenbach et al., 2002b, Olsen et al., 1995). Zusammen mit *B. afzelii* ist *B. garinii* die häufigste Genospezies in den meisten Ländern Europas (Bigl et al., 1999; Hanincova et al., 2003; Hildebrandt et al., 2003, Jenkins et al., 2001, Junttila et al., 1999; Lencakova et al., 2006). Über die Verbreitung der einzelnen OspA-Typen kann leider noch nicht viel gesagt werden, da die meisten Untersuchungen nur eine Bestimmung der Genospezies beinhalten. In Deutschland konnten alle acht OspA Serotypen nachgewiesen werden. Allerdings beschränkt sich der Nachweis des Serotyp 4 in Zecken bis jetzt nur auf eine Region in Bayern (Michel et al., 2004). Bei Untersuchungen in Mecklenburg-Vorpommern und Thüringen fehlte dieser (Hildebrandt et al., 2003, Lottmann et al. 1996). In Europa konnte er in der Slowakei, Tschechien und Polen in Zecken und außerdem in den Niederlanden und Dänemark in Patientenmaterial nachgewiesen werden (Lencakova et al., 2006, Marconi et al., 1999, Van Dam et al., 1997). Abbildung 2.3 zeigt die doch sehr differenzierte Verteilung der verschiedenen OspA –Serotypen in unterschiedlichem biologischem Material.

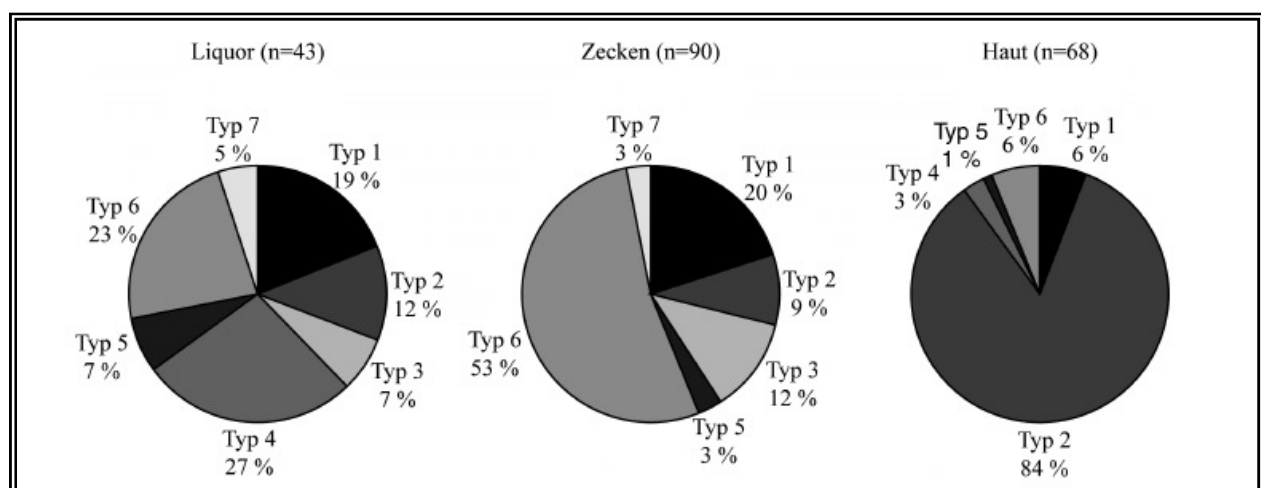


Abb. 2.3 Verteilung der *B. burgdorferi* OspA-Serotypen 1-7 in Isolat aus unterschiedlichem biologischem Material (Wilske et al., 2001)

Mit der Entwicklung genauerer Methoden wird auch *B. valaisiana* immer häufiger mitbestimmt. Diese Genospezies wurde und wird in vielen Studien nicht erfasst (Rauter und Hartung, 2005).

Mittels dieser Methoden kann *B. valaisiana* in drei Subtypen unterschieden werden (Godfroid et al., 2003; Wang et al., 2000). Viele Studien weisen *B. valaisiana* meist als dritthäufigste Genospezies nach (siehe Tab. 2.1; S. 15). In manchen Gegenden ist sie sogar dominant wie z. B. im Siebengebirge in Deutschland (Kampen et al., 2004) oder in Irland (Kirstein et al., 2000, Kurtenbach et al., 2001). *B. lusitaniae* konnte in Portugal (DeMichelis et al., 2000, Baptista et al., 2004) in der Schweiz (Jouda et al., 2004) in Osteuropa (Gern et al., 1999; Postic et al., 1997; Hubalek et al., 2003a) und Nordafrika (Younsi et al., 2005, Zhioua et al., 1999) gefunden werden. In Portugal war es sogar häufigste Genospezies. Einen Nachweis für *B. spielmanii* gibt es aus Deutschland, Tschechien und Frankreich (Derdakova et al., 2003; Fingerle et al., 2007, Michel et al., 2003; Richter et al., 2004)

2.2 Epidemiologie

2.2.1 Der Vektor- *Ixodes ricinus*

2.2.1.1 Lebenszyklus, Taxonomie, Anatomie und Wirtsbefall

Die in Mitteleuropa mit 90% häufigste Zeckenart *I. ricinus* ist auch der Hauptvektor für *B. burgdorferi* s. l. (Burgdorfer et al., 1984; Gern and Rais, 1996). Aber auch für andere Krankheitserreger wie das FSME Virus (Süss et al., 2006) Babesien (Donnelly and Peirce, 1975; Hartelt et al., 2004), Anaplasmen (Wilske und Fingerle, 1996, Hartelt et al., 2004) oder auch Rickettsien, Theilerien und Trypanosomen (Hubalek et al., 2003c, Ica et al., 2007, Parola et al., 2001) ist *I. ricinus* Vektor. Dabei kommt es auch zu Mischinfektionen dieser Erreger wie z.B. Anaplasmen und Borrelien (Fingerle et al., 1999, Hildebrandt et al., 2003, Levin & Fish, 2000; Loebermann et al., 2006, Piccolin et al., 2006), Babesien und Borrelien (Krause et al., 1996, Moro et al., 2006, Swanson et al., 2006). Die große Rolle, die der hematophagen Zecke *I. ricinus* als Vektor zukommt, hängt mit ihrer euryöken und euryphagen Lebensweise zusammen. In Deutschland parasitiert die Zecke an mindestens 80 Wirbeltierarten. *I. ricinus* ist eine dreiwirtige Zecke, die in ihrem zwei bis sechs jährigem Leben drei (Männchen zwei) Blutmahlzeiten benötigt um ihren Entwicklungszyklus zu beenden (Liebisch, 1991). Abhängig ist die Dauer dieses Zyklus von der Temperatur, dem saisonalen Timing und der Wirtsverfügbarkeit (Gray et al., 1991, Liebisch et al., 1991). Larven halten sich in der Gras- und Laubschicht bis 10 cm auf und befallen Kleinsäuger und Vögel. Nymphen haben ihren Lebensraum in ca. 10-50 cm hoher Krautschicht. Ihre Wirte sind größere Säuger, Vögel und der Mensch. Mehrere Studien zeigten die Nymphe als das Stadium, von dem der Mensch hauptsächlich befallen wird (Dorn et al., 2002, Hubalek et al., 2003; Liebisch et al., 1995; Maiwald et al., 1998, Robertson et al., 2000). Adulte Tiere sind bis zu einer Höhe von 1,50m zu

finden. Wirte sind Großsäuger und auch der Mensch. Nach der Mahlzeit häuten sich Larven und Nymphen zum nächsten Stadium. Bei diesem Prozess bleibt eine während des Saugprozesses aufgenommene Infektion erhalten. Man spricht von einer transstadiellen Weitergabe des Erregers. Die Weibchen legen nach dem Saugen 500-2000 Eier und sterben ab (Horst, 2003). Bei der sehr selten vorkommenden Weitergabe des Erregers an die Eier spricht man von einer transovariellen Übertragung. In Abbildung 2.4. ist der Entwicklungszyklus schematisch dargestellt. Für eine erfolgreiche Zirkulation von *B. burgdorferi* s. l. in einem Endemiegebiet ist es nötig, dass zwei verschiedenen Stadien von *I. ricinus* am selben Wirt saugen, um eine Reinfektion der Wirtspopulation zu gewährleisten (Tälleklint und Jaenson, 1994).

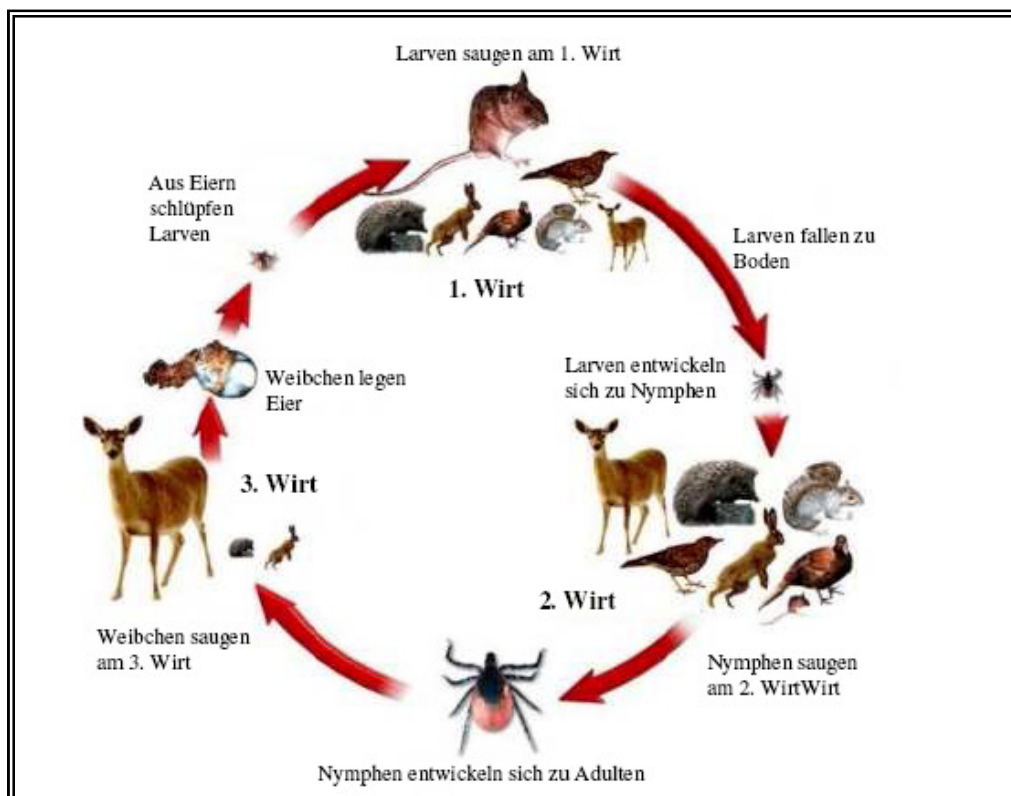


Abb. 2.4 Lebenszyklus von *I. ricinus* (nach Gray et al., 1998)

I. ricinus gehört dem Stamm der Arthropoden, Klasse der Arachnida und Ordnung der Acari an. Innerhalb der Unterordnung *Ixodida*, die man einteilt in *Argasidae* (Leder-) und *Ixodidae* (Schildzecken), gehören sie zu den Schildzecken. Diese zeichnen sich aus durch ein Scutum, ein dunkelbraunes bis schwarzes chitinsiertes Rückenschild, welches beim Männchen den ganzen Hinterleib und beim Weibchen etwa ein Drittel des braunroten Körpers bedeckt (Liebisch, 1991). Zu den Schildzecken gehören neben *I. ricinus* noch drei der wichtigsten Vektoren für *B. burgdorferi* s. l. in den temperierten Regionen der nördlichen Hemisphäre. Das sind *I. pacificus*, *I. persulcatus*, und *I. scapularis* (Brown and Lane, 1992, Dolan et al., 1997, Lane, 1994, Nakao and Sato, 1996, Peavey and Lane, 1995). Insgesamt konnten 42

Zeckenarten innerhalb der *Ixodida* als Träger von *B. burgdorferi* s. l. gefunden wurden, die fast alle den Schildzecken zuzuordnen sind (Baranton et al., 1998; Wang et al., 1999). Allerdings gelten nicht alle als vektorkompetent.

Der Körper von *I. ricinus* ist wie bei allen Acari ohne Einschnürung eingeteilt in ein Gnathosoma und Idiosoma. Das Gnathosoma, der Bereich der Mundwerkzeuge, besteht aus dem Hypostom (Stechborste), Pedipalpen (Kieferntasten) und den Cheliceren. Für einen besseren Halt beim Saugakt (Abb. 2.5), bei dem die Stechborste in den Wirt eingeführt wird, besitzen diese Widerhaken. Zwischen Cheliceren und Hypostom münden die Speicheldrüsen, welche Antikoagulantien, Enzyme, lokale Anästhetika und Toxine bilden, die in die Wunde abgegeben werden. Des Weiteren wird eine zementartige Substanz gebildet, mit der sich die Zecke im Laufe des Saugaktes einzementiert (Sonenshine et al., 1993). Das Idiosoma ist stark dehnbar und damit für die Aufnahme großer Mengen an Blut spezialisiert. Das Weibchen,



Abb. 2.5 Saugende Zecke (www.zecken.de)

welches das 100-200fache seines Körpergewichtes aufnehmen kann, erinnert im vollgesogenen Zustand an eine Rizinusbohne. Diesem Umstand verdankt sie ihren wissenschaftlichen Namen „*ricinus*“. Der Wirtsfindung dienen Chemorezeptoren an den Pedipalpen, Mechanorezeptoren und das Hallersche Organ, eine mit Sinnesborsten und –haaren ausgestattete Grube am Endtarsus des ersten Beinpaars,

welches Feuchtigkeit, CO₂ und Pheromone wahrnehmen kann. Nur der Bruchteil einer Sekunde reicht den wirtsuchenden Zecken aus, um sich mit Hilfe der am Ende aller Beinpaare befindlichen Krallen und Haftlappen am Wirt fest zu hängen. Dort sucht sie sich eine günstige Stelle, die wenig behaart und gut durchblutet ist und beginnt mit dem Saugakt (Liebisch, 1991, Sonenshine et al., 1993, Stanek und Hofmann, 1994). Eventuell im Blut des Wirtes vorhandene Mikroorganismen werden so durch die Zecke aufgenommen. Während des Saugaktes, der bei Larven 2-5 Tage, Nymphen 2-7 Tage und Adulten 6-11 Tage dauern kann, kommt es zu einer Abgabe großer Mengen Speichel, welcher eine wesentliche Rolle bei der Übertragung des Erregers spielt. Durch im Speichel enthaltenen Borrelien kommt es bei infizierten Zecken zur Übertragung des Erregers auf den Wirt (Humair et al., 1999, Kurtenbach et al., 1998b, Liebisch, 1991; Valenzuela et al. 2000). Die gesogene Zecke sekretiert vasoaktive und immunomodulatorische Substanzen, welche die Transmission des Erregers begünstigen. Man spricht von einer Speichel-unterstützten-Übertragung (Nutall et al., 2000, Pechova et al., 2002, Wikel et al., 1999).

2.2.1.2 *Borrelia burgdorferi* s. l. im Vektor und Transmission

In mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Borrelien in nüchternen Zecken andere Osp's exprimieren als beim Eintritt in den Wirt (De Silva et al., 1999, Fikrig et al., 1992b, Fingerle et al., 2000, Schwan et al., 1995; 2003). Am besten untersucht wurde hierbei das OspA, welches hauptsächlich im Darm nüchterner Zecken exprimiert wird (Fingerle, 1995). Das OspA dient beim Eindringen der Borrelien in den Vektor Zecke der Anhaftung an die Epithelzellen des Darmes und spielt damit eine wesentliche Rolle in der Interaktion zwischen Zecke und Borrelien (Pal et al., 2000). Die Transmission von *B. burgdorferi* s. l. von der Zecke in den Wirt ist ein sehr komplexer biologischer Prozess. Der Wechsel von einem System ohne Antikörper in ein System mit hohem immunologischem Potential erfordert von den Mikroorganismen ein hohes Maß an Anpassungsfähigkeit. Das Anheften der Zecke und der beginnende Saugakt ist der erste Schritt in der Übertragung der Borrelien. Der beginnende Blutstrom induziert eine Vermehrung der Borrelien im Darm (Piesman et al., 1990), sie durchdringen die Darmwand und gelangen in das Haemocoel und von dort in die Speicheldrüse (De Silva und Fikrig 1995, Gern et al., 1991). Während der Blutmahlzeit kommt es zu einer Herunterregulation des OspA, was zur Freisetzung der Borrelien aus dem Zeckendarm (Pal et al., 2000) und zu einer Expression von OspC führt (De Silva et al., 1999; Fingerle et al., 2002, Schwan et al., 1995; 2003). Der Anstieg der OspC Produktion ist verbunden mit der Wirts-Immunreaktion im Anfangsstadium des Saugaktes (Anguita et al., 2003; Pal 2004). Das Umschalten von OspA zu OspC Expression wird hauptsächlich der Temperaturänderung zugeschrieben (Obonyo et al., 1999, Pal et al., 2004). Neueste Untersuchungen zeigen auch einen Einfluss von CO₂ bei der Expression von OspC (Hyde et al., 2007). Die Zeit vom Stich bis zur erfolgreichen Transmission differiert zwischen Vektorspezies, *B. burgdorferi* s. l. Spezies und auch zwischen Stämmen derselben Genospezies. So zeigten sich 50% der Gerbils an die infizierte *I. ricinus* angesetzt wurden nach 17h positiv. Peavy und Lane (1995) fanden nur 11% der Mäuse nach 48h mit *Borrelia burgdorferi* sensu stricto infiziert. Vektor war *I. pacificus*. Neben der Änderung der Proteinstruktur von *B. burgdorferi* s. l. beim Saugakt spielt, wie schon erwähnt, auch der Speichel des Vektors eine wichtige Rolle um den Wirt erfolgreich zu infizieren (Valenzuela et al., 2000). Mit nur einem Prozent hat die transovarielle Übertragung eine untergeordnete Bedeutung im Infektionsprozess (Rauter und Hartung, 2005). Ein besonderer Vorgang ist das Co-feeding. Hier findet eine Übertragung von Borrelien einer infizierten Zecke auf eine nicht infizierte Zecke während eines gemeinsamen Saugaktes am Wirt statt, der nicht infiziert und auch kein Reserviertier sein muss (Gern and Rais, 1996; Randolph et al., 1996).

2.2.1.3 Verbreitung von *Ixodes ricinus* und Durchseuchung mit *Borrelia burgdorferi* s. l.

Das Vorkommen von *I. ricinus* wird wie die Entwicklung und die jahreszeitliche Aktivität durch die Temperatur- und hohen Luftfeuchteansprüche dieser Spezies bestimmt. Bevorzugt werden Pflanzengesellschaften mit hoher Luftfeuchte, wo die Zecken 99% ihres Lebens verbringen (Gray et al., 1998). Diese finden sie in Mischwäldern mit Unterholz und einer gut entwickelten Krautschicht. Wichtig ist vor allem eine feuchtigkeitspeichernde Streuauflage des Bodens, wo die verschiedenen Stadien unabhängig von klimatischen Verhältnissen auch extreme Trockenheit überdauern können. Die kritische relative Luftfeuchte liegt bei 92%. Bevorzugt werden außerdem Übergangsbereiche von Wald zur Krautschicht wie z. B. Wege. Estrada-Pena (1995) fanden in solchen Saumhabitaten die höchsten Zeckenzahlen. Auch Jacobi und Dorn (1995) konnten in ihren Untersuchungen Waldränder als Zeckenbiotope charakterisieren. Des Weiteren stellen angrenzende Wiesen, Parkanlagen, Waldlichtungen, Mischwälder, Übergänge von Laub- zu Nadelwald bzw. Hoch- zu Niederwald, Bach und Flussauen, Hecken- und Strauchbestände typische Mikrobiotope mit hoher Zeckendichte dar (Jacobi & Dorn, 1995). Man findet *I. ricinus* aufgrund dieser Ansprüche vorwiegend nördlich des 40. und südlich des 50.-60. Breitengrades vom Atlantik bis zum Ural in den gemäßigten Zonen Europas bis in eine Höhe von 2000 m (Horst, 2003). Auch in Nord-Afrika konnte die Zecke nachgewiesen werden (Nuttall and Labuda, 1998, Younsi et al., 2005). In Portugal macht *I. ricinus* allerdings nur einen kleinen Teil der Zeckenfauna aus. Hier dominieren *Rhipicephalus* und *Dermacentor*-Arten (Baptista et al., 2004). In Osteuropa überlappt das Vorkommen mit dem von *I. persulcatus*, ebenfalls ein wichtiger Vektor für *B. burgdorferi* s. l.

In Europa deckt sich die Verbreitung von *B. burgdorferi* s. l. mit der von *I. ricinus* (Horst, 2003). In *I. ricinus* konnten *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. lusitaniae*, *B. valaisiana* und *B. spielmanii* gefunden werden, wobei allerdings die Prävalenz und die vorkommenden Genospezies regionalen Unterschieden unterliegen (Baptista et al., 2004, De Michelis et al., 2001, Fingerle et al., 2004, Hubalek & Halouzka, 1998, Jenkins et al., 2001, Kurtenbach et al., 2001; Lencakova et al., 2006, Michel et al., 2004, Rauter und Hartung, 2005). Wichtig sind vor allem vorkommende Reservoirtiere, die die Zusammensetzung der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. bestimmen (Kurtenbach et al., 2001). In Mitteleuropa findet man alle sechs Erreger mit *B. afzelii* und *B. garinii* als häufigste Spezies, die in ihrer Häufigkeit alternieren (Tab. 2.1). Auch konnten alle sechs OspA Serotypen von *B. garinii* in *I. ricinus* nachgewiesen werden (Fingerle et al., 2004; Michel et al., 2003, Lencakova et al., 2006). Studien aus Deutschland zeigen ebenfalls *B. garinii* und *B. afzelii* als häufigste Genospezies mit unterschiedlichen Anteilen. Auch möglich sind Mischinfektionen der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. und der OspA Serotypen im Vektor. Diese resultieren entweder direkt aus dem Saugakt am Wirt, der mit mehreren Genospezies oder OspA Serotypen infiziert ist oder die Zecke hat die verschiedenen

Genospezies von verschiedenen Wirten während ihres Lebenszyklus aufgenommen (Haninkova et al., 2003, Kurtenbach et al., 1998, 2001). Hierbei kommt es aufgrund des Zusammentreffens von *B. burgdorferi* s. l. Genospezies mit dem Reservoirkomplement beim Saugakt, auf das später noch näher eingegangen wird, zu bevorzugten Kombinationen der Genospezies innerhalb einer Zecke (Hanincova et al., 2003; Kampen et al., 2004; Kurtenbach et al., 2001, 2002b). Eine Mischinfektion über das Co-feeding ist auch möglich. Kenntnisse über die Beeinflussung von Genospezies in der Zecke sind nicht bekannt (Korenberg et al., 2003). Nach der Metaanalyse von Rauter und Hartung (2005), die eine Zusammenfassung von 110 Studien zur Durchseuchung von *I. ricinus* in Europa anfertigten, war *B. garinii* und *B. valaisiana* die am häufigsten gefundene Mischung in Europa. Allerdings fand keine Unterscheidung der OspA-Serotypen von *B. garinii* statt. Bei Nymphen mit einer Mischinfektion kann man, da sie nur eine Blutmahlzeit aufgenommen haben, von einer Übernahme durch einen Wirt und einer transstadiellen Weitergabe dieser Mischinfektion ausgehen. Die Bedeutung für den Menschen liegt in der Möglichkeit, sich mit mehreren Genospezies zu infizieren, was sich in einem sehr differenzierten Krankheitsbild und widersprüchlichen Ergebnissen in der Labordiagnostik widerspiegeln kann (Demerschalk et al., 1995; Owen et al., 2006, Rijpkema et al., 1997). Hovius et al. (2007) konnten z.B. zeigen, dass es bei einer Mischinfektion von *B. burgdorferi* sensu stricto mit *B. garinii* OspA-Serotyp 4 zu mehr Fällen von Lyme-Arthritis kommt als bei einer Infektion mit *B. burgdorferi* sensu stricto alleine. Betrachtet man die Prävalenzen in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* eines Gebietes, so sind diese bedingt durch die unterschiedliche Anzahl von Blutmahlzeiten unterschiedlich hoch (Dorn et al., 1995, 1999, Hubalek et al., 2003a, Jouda et al., 2004, Michel et al., 2004, Stanczak et al., 2002). Rauter und Hartung (2005) fanden in Larven eine Prävalenz von ca. 1-3%, in Nymphen von ca. 10% und in adulten Tieren von ca. 20%. Nur in sehr wenigen Studien wurde in Nymphen eine höhere Durchseuchung als in den Adulten gefunden (Halouzka et al., 1995; Zhioua et al., 1996). Auch in lokal dicht beieinander liegenden Habitaten können die Prävalenzen stark abweichen (Dorn et al., 1995; Michel et al., 2004). Besonders hohe Prävalenzraten fanden sich z. B. in Portugal mit 75% positiven Zecken (De Michelis et al., 2000). Tabelle 2.1 zeigt die Infektionsraten aus verschiedenen Regionen Deutschlands und Europas.

Tab. 2.1 Prävalenzen von *B. burgdorferi* s. l. in Europa

| Gebiet | Prävalenz in % | | Genospezies (Anteile in %) | | | | Literatur |
|----------------|----------------|------|----------------------------|-------------|------|-----------|-------------------------|
| | Adulte | Ny | ss | afz | ga | val | |
| Süddeutschland | 21,8 | - | - | - | - | - | Baumgarten et al., 1999 |
| Süddeutschland | 40 | 30 | 10,7 | 60,9 | 29,3 | - | Rauter et al., 2002 |
| München | 21,7 | 10,8 | 11 | 25 | 61 | 1 | Michel et al., 2003 |
| Siebengebirge | 21,1 | 12,9 | 0 | 12 | 32 | 43 | Kampen et al., 2004 |

| | | | | | | | |
|---------------|------|------|------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Thüringen | 21 | 8,6 | 20,6 | 17,6 | 44,1 | 5,9 | Hildebrandt et al., 2003 |
| Sachsen | 23,7 | | 12,9 | 38,1 | 36,8 | - | Bigl et al., 1999 |
| Bonn | 26,6 | 17,3 | 15,6 | 39,5 | 27,9 | 8,6 | Maetzel et al., 2005 |
| Finnland | 32 | | 4 | 70 | 25 | - | Junttila et al., 1999 |
| West-Slowakei | 42,5 | 21,8 | 1,1 | 53 | 13,6 | 21,9 | Hanincova et al., 2003a |
| Ost-Slowakei | 22,4 | 9,6 | 29 | 10,3 | 49,6 | 11,1 | Lencakova et al., 2006 |
| Süd-Polen | 22,8 | 12,4 | 31 | 12 | 45 | 10 | Lencakova et al., 2006 |
| Moldavien | 36 | - | - | - | - | - | Movila et al., 2006 |
| Portugal | 75 | | - | - | - | - | DeMichelis et al., 2001 |
| Sibirien | 38 | - | - | - | - | - | Morozova et al., 2002 |
| Norwegen | 13,5 | 10,8 | 19,2 | 76,6 | 2,2 | - | Jenkins et al., 2001 |
| Irland | 17,8 | 18,5 | 18,1 | 9,6 | 17 | 35,1 | Kirstein et al., 1999 |
| Schweden | 11 | - | 13 | 44 | 31 | 6 | Fraenkel et al., 2002 |

2.2.2 Erregerreservoir

2.2.2.1 *Borrelia burgdorferi* s. l. und Reservoir

Die Verbreitung der Lyme Borreliose ist unmittelbar gekoppelt an das Vorhandensein von Reservoirwirten, die eine Schlüsselrolle im Transmissionszyklus von *B. burgdorferi* einnehmen. Von den Wirtstieren spielen die eine Rolle bei der Verbreitung des Erregers der Lyme Borreliose, die nach Erregeraufnahme und Vermehrung in der Lage sind, saugende Zecken zu infizieren, d.h. die Tiere mit einem hohen Reservoirpotential gegenüber *B. burgdorferi* s. l. (Humair et al., 1999, Tälleklint und Jaenson 1993). Um die Reservoirkompetenz eines Wirtes zu untersuchen, werden xenodiagnostische Tests angewendet. Dazu werden entweder die natürlich saugenden Larven oder im Labor angesetzte negative Zecken auf den Befall mit *B. burgdorferi* hin untersucht (Hanincova et al., 2003a, Huegli et al., 2002; Hu et al., 2001; Kurtenbach et al., 1998c). Eine weitere Möglichkeit ist die Analyse der Blutmahlzeit in der Zecke. Durch den Nachweis des Wirtes und der *B. burgdorferi* s. l. Infektion lassen sich Aussagen zur Reservoirrolle eines Wirtes machen (Gray et al., 1999; Pichon et al., 2003; 2005). Viele Untersuchungen zeigten eine strenge Wirtsspezifität, welche unabhängig von den äußeren Bedingungen ist. Verschiedene Geno – bzw. Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. unterscheiden sich in ihrer Übertragbarkeit zwischen Wirt und Vektor (Gylfe et al., 1999, Hanincova et al 2003a, Humair et al., 1999; Hu et al., 2001, Kurtenbach et al., 1998b; 2002b). So konnten aus Kleinsäugetieren wie z. B. *Apodemus sylvaticus* ausschließlich *B. afzelii* und *B. garinii* OspA Serotyp 4 isoliert werden (Hu et al., 2001, Humair et al., 1995; Humair et al., 1999; Kurtenbach et al., 1998), während in Vögeln diese Genospezies nicht gefunden werden konnte. Sie waren infiziert mit *B. valaisiana* und *B. garinii* (Hanincova et al., 2003; Kurtenbach et al.,

2002c, Mannelli et al., 2005, Olsen et al., 1995). Man kann davon ausgehen, dass zwei hauptsächliche Transmissionszyklen bei der Verbreitung von *B. burgdorferi* s. l. eine Rolle spielen: der Kleinsäuger-Zecke- und der Vogel-Zecke-Zyklus (Gern et al., 1998, Kurtenbach et al., 1998, Nakao et al., 1994). *B. burgdorferi* sensu stricto nimmt an beiden Zyklen teil und scheint nicht spezialisiert zu sein.




Der Mechanismus, der dieser Auswahl an Reserviertieren unterliegt, und damit die unterschiedlichen Transmissionszyklen bestimmt, ist mit großer Wahrscheinlichkeit in der Immunantwort des Wirtes auf die verschiedenen Borrelien-Genospezies begründet (Kraiczy et al., 2002, Kurtenbach et al., 1998a, 2002a; Nelson et al., 2000). Ein oft vorgeschlagenes Modell der Transmission geht davon aus, dass bereits im Darm der saugenden Zecke, durch das im Blut vorhandene Komplementsystem des Wirtes, eine Selektion, d.h. eine speziesspezifische Lyse bzw. Resistenz der Spirochäten erfolgt. (Kurtenbach et al., 2001; Kurtenbach et al., 2002a; b; Stevenson et al., 2006). Im Laufe der Evolution haben die Mikroorganismen Mechanismen entwickelt, um dem Komplementsystem zu entgehen. Die Resistenz der Spirochäten gegenüber dem Komplementsystem wird durch die Expression von CRASPs vermittelt (Kraiczy et al., 2001a; b; 2006, von Lackum et al., 2005), welche eine Bindung mit den durch das Komplementsystem des Wirts gebildeten Proteinen (Faktor H Protein und Faktor H ähnliches Protein 1) eingehen und damit eine wesentliche Rolle bei der Invasion des Erregers spielen (Alitalo et al., 2002; Hellwage et al., 2001; Stevenson et al., 2002; von Lackum et al., 2005). Tabelle 2.2 zeigt die Ergebnisse verschiedener Resistenzstudien von verschiedenen Komplementsystemen mit einer Anzahl von Borrelienstämmen modifiziert nach Kurtenbach et al. (Kurtenbach et al., 2001) Die Angaben für den Wirt Mensch wurden von Kraiczy et al. (2002) übernommen. Das unterschiedliche Überleben von *B. burgdorferi* s. l. im Darm der Zecke kann dazu führen, dass eine Genospezies aufgenommen und eine bereits im Darm vorhandene vernichtet wird. So kommt es z.B. dazu, dass in der Natur die Mischinfektion *B. afzelii* mit *B. garinii* seltener angetroffen wird, während Mischinfektionen von *B. valaisiana* mit *B. garinii* oder *B. afzelii* mit *B. garinii* OspA Serotyp4 öfter auftreten (Kampen et al., 2004; Kurtenbach et al., 2001, Lencakova et al., 2006, Michel et al., 2003). In ungesogenen Zecken ist die CRASPs Produktion der Borrelien sehr gering. Beim Saugen am Wirt steigt die Produktion stark an und bleibt auf dem gleichen Level. Beim Übergang in eine Zecke wird die CRASPs Produktion wieder herunterreguliert (von Lackum et al., 2005). Es wird davon ausgegangen, dass, ähnlich wie beim OspC der Temperaturanstieg für den Start der Expression verantwortlich ist (Stevenson et al., 1995; Stevenson et al., 1998a). Es besteht die Hypothese, dass ein Erreger mehrere CRASPs exprimieren kann um die verschiedensten Wirte zu infizieren. So wurden von Kraiczy et al. (2006) das CRASP-1 als einzigstes Mitglied dieser Proteinfamilie gefunden, das an das menschliche Komplement binden kann. Dem Modell der Selektion im Zeckendarm widersprechen Rathinavelu et al. (2003) mit der Auffassung, dass das

Komplementsystem im Darm der Zecke inaktiviert wird und so keinen Einfluss auf die Selektion der Borrelien hat.

In den meisten Wirten persistiert der Erreger nach erfolgreicher Infektion und ausbleibender rechtzeitiger Therapie ein Leben lang (Gern et al., 1994; Kurtenbach et al., 1994). Beim Saugen eines Vektors kann der Erreger dann auf diesen übertragen werden, wobei die Transmission vom Wirt auf den Vektor schneller geht als umgekehrt (Piesmann, 1991).

Tab. 2.2 Resistenzen von *B. burgdorferi* s. l. Genospezies gegenüber dem Komplement verschiedener Wirte (nach Kurtenbach et al., 2001)

| Reservoir | <i>B. b. s. s.</i> | <i>B. afzelii</i> | <i>B. garinii</i> 4 | <i>B. garinii</i> (3-8) | <i>B. lusitaniae</i> | <i>B. valaisiana</i> |
|--------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| Rötelmaus | | | | | | |
| Eichhörnchen | | | | | | |
| Gelbhalsmaus | | | | | | |
| Waldmaus | | | | | | |
| Fasan | | | | | | |
| Amsel | | | | | | |
| Schaf | | | | | | |
| Pferd | | | | | | |
| Schwein | | | | | | |
| Rotwild | | | | | | |
| Mensch | | | ND | | ND | ND |

-  resistent gegenüber dem Wirtskomplement
 teilweise resistent gegenüber dem Wirtskomplement
 sensitiv gegenüber dem Wirtskomplement

2.2.2.2 Kleinsäuger als Reservoir

Weltweit sind Kleinsäuger mit einem breiten Spektrum von pathogenen Infektionskrankheiten assoziiert. Sie sind die wichtigsten Wirtstiere der Larven von *I. ricinus* (Anderson et al., 2006, De Boer et al., 1993; Hanincova et al., 2003b, Humair et al., 1999, Kurtenbach et al., 1998b). Unter den Kleinsäufern sind vor allem Rodentia bevorzugte Wirte subadulter Zeckenstadien und Reservoir für Borrelien in Europa, wobei besonders Muridae und Arvicolidae kompetente Reservoir für *B. burgdorferi* s. l. und gleichzeitig Indikatoren für die Abundanz von larvalen *I. ricinus* darstellen. Aufgrund ihrer hohen Kapazität, die larvalen Stadien zu infizieren, dienen sie als Reservoir für eine stabile Zirkulation des Erregers (Humair et al., 1999, Kurtenbach et al., 1994). Die Annahme, dass kleinere Nagetiere die zentrale Rolle in der Epidemiologie der Lyme Borreliose in Europa spielen (De Boer et al., 1993; Gern et al., 1994; Tälleklint und Jaenson

1994) konnte nicht lange aufrechterhalten werden. So konnte in Irland trotz hoher Kleinsäugerdichte und hoher Infektionsrate der Zecken nur eine geringe Durchseuchung der Mäuse gefunden werden, was hier auf die fehlende Infestation mit Nymphen zurückzuführen ist (Gray et al., 2000). Die häufigsten Kleinsäuger in Zentraleuropa sind *Apodemus* und *Myodes* Arten vor allem die Rötelmaus (*Myodes glareolus*) und die Gelbhalsmaus (*Apodemus flavicollis*) und damit auch die wichtigsten Wirte für die Larven von *I. ricinus* (Hanincova et al., 2003b, Kurtenbach et al., 1998b, Labuda et al., 1997). Studien in Thüringen zeigten auch hier, dass diese beiden Arten wichtige Wirte für die Larven von *I. ricinus* darstellen (Sünder, 2003). In allen Untersuchungen konnten wesentlich mehr Larven als Nymphen von Mäusen abgesammelt werden. Das Verhältnis liegt bei ungefähr 10:1 (Khanakah et al., 2006, Pawelczyk et al., 2004, Sünder, 2003). Ihre Rolle als kompetente Reservoir konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Gray et al., 2000; Humair et al., 1999; Kurtenbach et al., 1998b). Der Nachweis von *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. burgdorferi* sensu stricto in abgesammelten Larven oder entnommenen Proben zeigt die Reservoirkompetenz der Kleinsäuger für diese Genospezies. Da in Laborversuchen gezeigt wurde, dass alle *B. garinii* OspA Serotypen mit Ausnahme des Serotyp 4 komplementsensitiv gegenüber Kleinsäugetern reagieren, kann man davon ausgehen, dass es sich bei den *B. garinii* positiven Proben um eben diesen Serotyp handelt. Untersuchungen von Freilandzecken aus Gebieten, wo *B. garinii* in Mäusen nachgewiesen wurde, bestätigten auch eine hohe Prävalenz des Serotyp 4 (Lencakova et al., 2006). Allerdings gibt es nur sehr wenige Untersuchungen bezüglich der OspA Serotypen um die Reservoirtierrolle für *B. garinii* OspA Serotyp 4 zu bestätigen. Huegli et al. (2002) fanden, dass alle in Zecken von *Apodemus* Mäusen gefundenen *B. garinii* Stämme dem Serotyp 4 entsprachen. Dass eine Übertragung des OspA-Serotyp 4 auf xenodiagnostische Zecken stattfindet, konnte in Laborversuchen nachgewiesen werden (Hu et al., 2001). Xenodiagnostische Tests zeigten auch, dass die Übertragungsrate ähnlich wie bei *B. afzelii* ist (Huegli et al., 2002). Für *B. burgdorferi* sensu stricto wurde in Versuchen eine geringere Übertragungsrate als für *B. afzelii* nachgewiesen, was wahrscheinlich an einer schlechteren Anpassung an den Wirt liegt (Richter et al., 2004). *B. burgdorferi* sensu stricto zeigt eine teilweise Resistenz gegenüber allen Reservoirwirten und ist damit nicht spezialisiert (Kurtenbach et al., 2001).

In deutschlandweiten Untersuchungen fand man, dass in vielen Gebieten *B. afzelii* die dominierende Genospezies in freilandgefangenen Zecken ist, was für eine dominante Rolle der Kleinsäuger in diesen Gebiete spricht (Bigl et al., 1999; Kurtenbach et al., 2001; Oehme et al., 2002; Rauter et al., 2002). Der mit Kleinsäugetern assoziierende *B. garinii* OspA Serotyp 4 konnte bis jetzt nur in Zecken eines Habitats in München gefunden werden (Michel et al., 2004). Eine mit *B. valaisiana* verwandte Art konnte in Kleinsäugetern in Japan nachgewiesen werden (Masuzawa et al., 2004).

2.2.2.3 Vögel als Reservoir



Abb. 2.6 Mit Zecken infestierter Vogel
(Foto: Andreas Goedecke)

Zu den wichtigsten Reserviertieren von *B. burgdorferi* s. l. gehören Vögel. In vielen Untersuchungen konnten bei bestimmten Arten hohe Infestationsraten mit *I. ricinus* festgestellt werden (Mannelli et al., 2005, Hanincova et al., 2003a; Wright et al., 2006). Des Weiteren finden sich mit Larven und Nymphen zwei Entwicklungsstadien als Vektoren an Vögeln, was eine wichtige Rolle bei der Beurteilung der Vektorkompetenz ist.

Insbesondere agieren Zugvögel oftmals als Transportwirte und dienen damit der Verbreitung des Erregers über zum Teil große Distanzen. Vergleichbar ist dies mit der Verbreitung von Krankheitserregern durch Menschen mittels Flugzeug (Marie - Angele et al., 2006, Olsen et al., 1993; Olsen et al., 1995 a, b; Reed et al., 2003). Studien zeigten, dass vogelassoziierte Stämme einem hohen Grad an Migration unterliegen (Gylfe et al., 1999; Gylfe et al., 2000). Kurtenbach et al. (2002b) stellte bei phylogenetischen Untersuchungen fest, dass sehr eng verwandte *B. garinii* Stämme gleichzeitig in Portugal und in England vorkommen. Eine bedeutende Rolle der Singvögel in der Ökologie von *B. burgdorferi* s. l. konnte in mehreren Studien in Deutschland, Polen, Tschechien, Slowakei, Italien, Skandinavien und auch in Nordamerika bestätigt werden (Hanincova et al., 2003a, Hubalek et al., 1996, Kaiser et al., 2002, Michalik et al., 2007, Olsén et al., 1995a, b). In der Slowakei wurden von Amseln, Singdrosseln und der Kohlmeise infizierte Zecken abgesammelt (Hanincova et al., 2003a). Bei Untersuchungen in Italien fanden sich allein an Amseln, die auch die höchsten Infestationsraten zeigten, infizierte Zecken (Mannelli et al., 2005). Kaiser et al. (2002) fanden in Deutschland bei Nachtigall, Zilpzalp und Rotkehlchen infizierte Larven. Amseln spielten hier keine Rolle. Die abgesammelten Zecken aller Untersuchungen waren infiziert mit *B. garinii* und *B. valaisiana*, wobei meist *B. garinii* die häufigste Genospezies war. *B. afzelii* konnte nicht nachgewiesen werden (Olsen et al., 1995b; Hanincova et al., 2003a; Mannelli et al., 2005). Abgesammelte *I. ricinus* Zecken von Zugvögel in der Schweiz zeigten außerdem eine Infektion mit *B. lusitaniae* (Marie-Angele et al., 2006). Vögel sind also auch mögliches Reservoir für diese Genospezies. Der Fasan als am Boden lebender, in Deutschland nur selten anzutreffender Vogel, konnte in Irland als Reservoir für *B. garinii* und *B. valaisiana* bestimmt werden (Kurtenbach et al., 1998c). Mit *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii* und *B. valaisiana* infizierte Nymphen zeigten nach der Blutmahlzeit an Vögeln im Labor, dass alle Genospezies außer *B. afzelii* in der Zecke

überlebten. *B. afzelii* zeigte sich serumsensitiv und wird in der Zecke durch das Vogel-Komplementsystem vernichtet, was die Theorie bestätigt, dass bereits in der Zecke eine Selektion der Genospezies stattfindet (Kurtenbach et al., 2001; Kurtenbach et al., 2002a). In keinem Vogel konnte eine Infektion mit *B. afzelii* nachgewiesen werden (Kurtenbach et al., 2002b). In Nordamerika sind Vögel Reservoir für die einzig vorkommende pathogene Art *B. burgdorferi* sensu stricto (Wright et al., 2006). Hier zeigte sich das Amerikanische Rotkehlchen als besonders kompetent (Ginsberg et al., 2005).

2.2.2.4 Andere Reservoirtiere

Großsäuger wie das Rehwild (*Capreolus capreolus*) sind als Nahrungsquelle für die Zecken wichtig. Als Wirt vorwiegend für die adulten Stadien dienen sie als Ort für die Kopulation. Als Reservoir scheinen die adulten Tiere keine Rolle zu spielen. Fingerle et al. (2007) konnten für die Jungtiere aber eine Reservoirfunktion feststellen (Fingerle et al., 2007, Gray et al., 1999, Magnarelli et al., 1995). Der Igel (*Erinaceus europaeus*), weist eine hohe Befallsrate mit infizierten Larven und Nymphen auf (Gern et al., 1997, Gray et al., 1994). Zwar gelang Liebisch (1997) die Erregerisolierung aus Biopsiematerial aber xenodiagnostische Tests sind bisher nicht bekannt. Ebenso zeigte sich der Feldhase (*Lepus timidus*) als Wirt aller drei Stadien von *I. ricinus* aber auch dessen Rolle als Reservoir bleibt ungeklärt (Tälleklund und Jaenson, 1996). Craine et al. (1997) konnte das Grauhörnchen (*Sciurus carolinensis*) in England als Reservoir für *B. afzelii* und *B. burgdorferi* sensu stricto identifizieren. Ebenfalls für *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. afzelii* ist das Eichhörnchen (*Sciurus vulgaris*) in der Schweiz Reservoir (Humair & Gern, 1998). Sein Verwandter, das Grauhörnchen (*Sciurus griseus*) in Amerika ist Reservoir für *B. burgdorferi* sensu stricto (Lane et al., 2005). Studien in Brandenburg konnten dem Fuchs (*Lupus lupus*) keine eindeutige Rolle als Reservoir zuschreiben. In Biopsiematerial konnten keine Borrelien nachgewiesen werden (Heidrich et al., 1999). Haustiere sind sehr oft von Zecken befallen, inwieweit sie allerdings durch die Persistenz des Erregers auch zum Reservoir werden ist noch nicht geklärt (Liebisch, 1997), allerdings dürfte durch das Absammeln der Zecken die Bedeutung als Reservoir gering sein.

2.2.3 Nachweis von *Borrelia burgdorferi* s. l. in epidemiologischen Studien

Der Nachweis von Borrelien in der Zecke kann mittels Kultur, Immunofluoreszenztest oder PCR erfolgen. *B. burgdorferi* s. l. lässt sich auf BSK-H Medium bei 30°C bis 34°C kultivieren. Sie können dabei eine Generationszeit von 11-12 Stunden erreichen (Barbour, 1984). Da die **Kultivierung** sehr zeitaufwendig, teuer und nicht sensitiv genug ist, wird sie für epidemiologische Studien kaum noch verwendet. Außerdem zeigte sich, dass die einzelnen

Genospezies ihr Wachstum gegenseitig beeinflussen (Liveris et al., 1999). Der **Immunofluoreszenz-Test** ist ein zellulärer Nachweis von Antigenen, der, sehr preiswert, gute Ergebnisse in epidemiologischen Studien bietet, allerdings mit dem Nachteil, dass keine Genospezies unterschieden werden können.

Der direkte Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. in der Zecke mittels **PCR** hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen. Dadurch wird die in vitro Selektion vermindert und die natürliche genetische Diversität nachgewiesen. Angewandt werden Genospezies-spezifische PCR's, wo anhand des PCR Produktes Aussagen zur Genospezies getroffen werden können (Dermaschalk et al., 1995). Meist verwendet wird eine nested PCR, bei der anschließend an die erste PCR zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität ein weiterer Amplifizierungsschritt angeschlossen wird. Verwendete Zielsequenzen sind z. B. das OspA Gen (Vasiliu et al., 1998, Michel et al., 2004), das OspC Gen (Masuzawa et al., 1996; Wang et al., 1999) oder die 5S-23S rDNA intergenic spacer region Sequenz (Postic et al., 1997, Rijpkema et al., 1997). Eine weitere auf der PCR basierende Methode ist die **PCR- RFLP** (**R**estriktions-**f**ragment-**L**ängen**p**olymorphismus). Hier wird nach der PCR das Produkt mittels Restriktionsenzymen geschnitten und anhand bestimmter Bandenmuster die Genospezies bestimmt. Mittels dieser Methode kann bis auf Serotyp-Ebene bestimmt werden (DeMichelis et al., 2001, Michel et al., 2003). Ebenfalls anschließend an die PCR kann ein Reverse Line blot (**RLB**) durchgeführt werden (Lunemann et al., 2001). Die **Real-Time PCR** ist eine PCR-Methode zur Quantifizierung von PCR-Produkten (Wang et al., 2003). Die Sequenzierung ist ebenfalls ein wichtiges Mittel zur Charakterisierung von *B. burgdorferi*. Die *16S rRNA*, die *5S-23S rRNA*, das *fla* Gen und das *OspA*-Gen sind sehr konservierte Gene und eignen sich deshalb sehr gut zum Vergleich verschiedener Stämme und für phylogenetische Untersuchungen (Le Fleche et al., 1997; Wang et al., 1997).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Aufgabenstellung

Fasst man den gegenwärtigen Kenntnisstand über die Lyme Borreliose zusammen, so kann man festhalten, dass sie sowohl durch eine Vielzahl an Erregern als auch eine Vielzahl klinischer Bilder und durch differenzierte epidemiologische Muster charakterisiert ist.

Detaillierte Untersuchungen in Endemiegebieten, die Kenntnisse über die Transmissionszyklen der verschiedenen Genospezies liefern, sind nötig, um die Ökologie dieser Krankheit zu verstehen und Methoden der Risikoabschätzung zu entwickeln. Ein Schlüsselfaktor dabei sind das Vorkommen und Überleben der einzelnen Genospezies und Subspezies von *B. burgdorferi* im Vektor und Wirt. In Thüringen sind solche Daten selten und lassen noch Fragen offen. Die hier vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel, potentielle Reservoiretiere auf Zeckenbefall und vorkommende Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. hin zu untersuchen. Des Weiteren sollte das Vorkommen und die Verbreitung der Genospezies in Thüringen im Vektor *I. ricinus* bestimmt werden. Wichtig hierbei war die Bestimmung der OspA Serotypen, da gerade die Verteilung dieser OspA Serotypen bedeutende Informationen zur Klassifizierung von Habitaten in Bezug auf das Risiko der Lyme Borreliose und wichtige Informationen zur Impfstoffentwicklung liefert. Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen der Arbeit geklärt werden:

a) Welche Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. können in Thüringer Borrelien-Isolaten nachgewiesen werden?

In dieser Arbeit sollten daher:

- eine PCR-RFLP Technik zur Differenzierung der Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. etabliert werden.
- die Genospezies und OspA-Serotypen von 121 Thüringer Isolaten bestimmt und mit den Ergebnissen anderer PCR-Methoden verglichen werden.
- die Sequenzen einer Auswahl an Isolaten bestimmt und mit in der Gen-Datenbank vorhandenen Sequenzen verglichen werden.

b) Gibt es regionale und saisonale Unterschiede hinsichtlich der Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. in Thüringen?

Dazu sollte in dieser Arbeit:

- die Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. in nüchternen Zecken aus 50 Habitaten mittels PCR des *OspA*-Gens und IIFT bestimmt und die Ergebnisse verglichen werden.

- mittels RFLP die Genospezies und OspA-Serotypen der positiven PCR-Proben bestimmt werden.
- saisonale Unterschiede in der Prävalenz und Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. im Habitat Bad Berka untersucht werden.

c) Welche Rolle spielen Vögel und Kleinsäuger in den untersuchten Gebieten bei der Verbreitung der unterschiedlichen Genospezies von *B. burgdorferi* s. l.?

Dazu wurden:

- mehrere Extraktionsmethoden für das Arbeiten mit gesogenen Zecken getestet.
- von Vögeln und Kleinsäufern abgesammelte Zecken mittels PCR-RFLP auf Borrelien untersucht und die Genospezies bestimmt.
- Sequenzdaten positiver Vogelzecken mit den Sequenzen Thüringer Isolate und Sequenzen aus der Gen-Datenbank verglichen.
- die Antikörpertiter im von Kleinsäufern entnommenen Blut bestimmt.

d) Korrelieren die Daten von Krankheitsfällen in Thüringen mit den gefundenen Prävalenzdaten?

- Für diese Fragestellung wurden die Krankheitsfälle mit den entsprechenden Symptomen in Thüringen regional ausgewertet und mit den Prävalenzdaten und der Verteilung der Genospezies in freilandgefangenen und vom Menschen abgesammelter Zecken verglichen.

3.2 Geräte, Arbeitsmittel und Chemikalien

3.2.1 Geräte

| | |
|---|---|
| Brutschrank (Typ BE600) Memmert | Schwabach |
| Analysenwaage (Sartorius Basic plus) | Sartorius AG, Göttingen |
| Fluoreszenzmikroskop (Axiolab H350) | Carl Zeiss Jena GmbH, Jena |
| Durchlichtmikroskop (RML 5) | Optik Rathenow, Rathenow |
| Ultrazentrifuge (Z233) | Hermle, Wehlingen |
| Thermocycler (T48 personal) | Biometra, Göttingen |
| Geldokumentationssystem (Fluor-S Multilmager) | BioRad, München |
| Elektrophoresesystem (Savant HG 330) | NeoLab, Heidelberg |
| Spannungsquelle (EC 250-90) | NeoLab, Heidelberg |
| Heizrührplatte (Monotherm variomag) | H+P Labortechnik GmbH, München |
| Laborbrenner (Gasprofi) | Wartwig Labor- und Dentaltechnik, Göttingen |

| | |
|--|--|
| Mikrowellengerät (HTM 752) | Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München |
| Minischüttler (Typ VF 2) | IKA Labortechnik, Staufen |
| Sterile Werkbank (HeraSafe HS12) | Heraeus Instruments GmbH, Gera |
| Zentrifuge (universal 1200) | Hettig, Tuttlingen |
| Dampfsterilisator (Varioklav 400) | H+P Labortechnik, Oberschleißheim |
| pH-Meter (CG840) | Schott, Jena |
| Spektrophotometer (UV/VIS) | Benda, Wiesloch |
| Wasserbad (GFL, 1008) | Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel |
| Sequenzierautomat: ABI PRISM 377 DNA Sequencer | Applied Biosystems, Weiterstadt |

3.2.2 Arbeitsmittel

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| Pipetten (Research) | Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln |
| Pipettenspitzen | Roth, Karlsruhe |
| Pasteur-Pipetten | Roth, Karlsruhe |
| Reaktionsgefäß (1,5ml und 2ml) | Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln |
| Kulturröhrchen (8ml) | Falcon |
| Mikropistille | Roth, Karlsruhe |
| Einschlussmedium | BAG GmbH, Lich |
| Immersionsöl (518F) | Zeiss, Jena |

3.2.3 Chemikalien

Soweit nicht extra aufgeführt wurden Chemikalien der Firma Carl Roth, Karlsruhe in der höchsten Reinheitsstufe verwendet.

| | |
|--------------------------------------|------------------------|
| Probenpuffer (gebrauchsfertig) | SIGMA, Taufkirchen |
| Ammoniumperoxodisulfat | SIGMA, Taufkirchen |
| TEMED (Tetramethylethyldiamin) | SIGMA, Taufkirchen |
| BSA (10mg/ml) | Promega, Mannheim |
| MgCl ₂ (25mM) | SIGMA, Taufkirchen |
| Primer (100pmol/μl) | MWG Biotech, Ebersberg |
| Ethidiumbromid | SIGMA, Taufkirchen |

Restriktionsenzyme

| | |
|--|----------------------------|
| HINDIII, BGLII, SSPI, SFU (10U/μl) | Promega, Mannheim |
| KPN 2I (10U/μl) | MBI Fermentas, St.Leon-Rot |
| Tru9 (10U/μl) | Promega, Mannheim |

Polymerase (HotMaster Taq 5U/μl)Eppendorf, Hamburg

Fertigmedium

BSK-H-MediumSIGMA, Taufkirchen

Kaninchen-SerumSIGMA, Taufkirchen

Standards für die Gelelektrophorese

DNA-Standard (50bp Ladder)SIGMA, Taufkirchen

DNA-Standard (20bp Ladder)SIGMA, Taufkirchen

Kits

DNeasy Tissue Kit Qiagen, Hilden

GenElute™ Bacterial Genomic DNA KitSIGMA, Taufkirchen

High Pure PCR Produkt Purifikation KitRoche Molecular Biochemicals, Mannheim

Big Dye ABI PRISMApplied Biosystems, Weiterstadt

3.3 Probenmaterial

3.3.1 Bakterienkulturen

121 Kulturen aus freilandgefangenen Adultzecken (404) und Nymphen (407), die im Rahmen einer Dissertation von Frau Dr. B. Steil und Frau C. Flügel gewonnen wurden, konnten für eine Charakterisierung der Genospezies und des OspA-Typs mittels PCR-RFLP und stichprobenartiger Sequenzierung verwendet werden. Die Zecken stammten aus drei Habitaten im Ilmtal: Belvedere, ein Erholungspark in der Nähe von Weimar mit starker gärtnerischer Beeinflussung, Dienststedt, ein naturbelassener Waldstandort und Bad Berka, ein Waldgebiet in der Nähe einer Klinik. Die Kultivierung erfolgt im BSK-H-Medium bei 32,7 °C für max. 8 Wochen. In der stationären Phase wurden die Kulturen bei -80 °C eingefroren.

In Tabelle 3.1 sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Bakterienstämme bezeichnet und näher beschrieben.

Tab. 3.1 *B. burgdorferi* s. l. -Isolate aus den Habitaten Bad Berka, Belvedere, Dienststedt, Thüringen, 2002

| Bad Berka | Stadium | Datum | Dienststedt | Stadium | Datum | Belvedere | Stadium | Datum |
|-----------|----------|-------|-------------|----------|-------|-----------|----------|-------|
| 1 | Männchen | 27.4 | 1 | Männchen | 5.5 | 1 | Weibchen | 27.4 |
| 2 | Männchen | 16.6 | 2 | Männchen | 5.5 | 2 | Weibchen | 27.4 |
| 3 | Männchen | 12.5 | 3 | Männchen | 2.6 | 3 | Weibchen | 12.5 |
| 4 | Weibchen | 16.6 | 4 | Weibchen | 2.6 | 4 | Männchen | 12.5 |
| 5 | Nymphe | 16.6 | 5 | Nymphe | 2.6 | 5 | Weibchen | 12.5 |
| 6 | Weibchen | 8.7 | 6 | Weibchen | 2.6 | 6 | Nymphe | 12.5 |
| 7 | Männchen | 8.7 | 7 | Männchen | 2.6 | 7 | Nymphe | 12.5 |
| 8 | Weibchen | 8.7 | 8 | Weibchen | 16.6 | 8 | Nymphe | 2.6 |
| 9 | Männchen | 8.7 | 9 | Männchen | 8.7 | 9 | Weibchen | 2.6 |

| | | | | | | | | |
|----|----------|------|----|----------|------|----|----------|------|
| 10 | Nymphe | 1.7 | 10 | Nymphe | 8.7 | 10 | Nymphe | 2.6 |
| 11 | Weibchen | 16.6 | 11 | Männchen | 8.7 | 11 | Weibchen | 2.6 |
| 12 | Männchen | 16.6 | 12 | Weibchen | 8.7 | 12 | Männchen | 2.6 |
| 13 | Männchen | 16.6 | 13 | Männchen | 14.9 | 13 | Nymphe | 16.6 |
| 14 | Nymphe | 1.7 | 14 | Weibchen | 10.8 | 14 | Männchen | 1.7 |
| 15 | Nymphe | 1.7 | 15 | Weibchen | 10.8 | 16 | Nymphe | 16.6 |
| 16 | Weibchen | 8.7 | 17 | Nymphe | 1.7 | 17 | Männchen | 16.6 |
| 17 | Männchen | 16.6 | 18 | Nymphe | 27.9 | 18 | Männchen | 1.7 |
| 18 | Nymphe | 1.7 | 19 | Männchen | 1.8 | 19 | Nymphe | 2.6 |
| 19 | Nymphe | 1.7 | 20 | Männchen | 1.8 | 21 | Nymphe | 26.7 |
| 20 | Weibchen | 26.7 | 21 | Männchen | 14.9 | 22 | Nymphe | 26.7 |
| 21 | Männchen | 4.8 | 22 | Männchen | 26.7 | 23 | Männchen | 26.7 |
| 22 | Weibchen | 10.8 | 23 | Weibchen | 27.9 | 24 | Nymphe | 26.7 |
| 23 | Nymphe | 26.7 | 24 | Nymphe | 14.9 | 25 | Weibchen | 26.7 |
| 24 | Nymphe | 4.8 | 25 | Weibchen | 27.9 | 26 | Nymphe | 10.8 |
| 25 | Männchen | 10.8 | 26 | Nymphe | 27.9 | 27 | Nymphe | 10.8 |
| 26 | Männchen | 10.8 | 27 | Weibchen | 20.9 | 28 | Männchen | 26.7 |
| 27 | Weibchen | 10.8 | 28 | Nymphe | 20.9 | 29 | Weibchen | 1.9 |
| 28 | Männchen | 10.8 | 29 | Nymphe | 27.9 | 30 | Männchen | 14.9 |
| 29 | Nymphe | 1.7 | 30 | Männchen | 27.9 | 31 | Weibchen | 1.9 |
| 30 | Männchen | 10.8 | | | | 32 | Weibchen | 8.9 |
| 31 | Nymphe | 1.9 | | | | 33 | Männchen | 1.9 |
| 32 | Weibchen | 1.9 | | | | 34 | Nymphe | 20.9 |
| 33 | Nymphe | 1.9 | | | | 35 | Männchen | 26.7 |
| 34 | Weibchen | 14.9 | | | | 36 | Nymphe | 14.9 |
| 36 | Weibchen | 8.9 | | | | 38 | Nymphe | 20.9 |
| 37 | Weibchen | 8.9 | | | | 39 | Weibchen | 20.9 |
| 38 | Nymphe | 26.7 | | | | 40 | Männchen | 8.9 |
| 40 | Männchen | 14.9 | | | | 41 | Weibchen | 4.8 |
| 41 | Nymphe | 14.9 | | | | 42 | Nymphe | 14.9 |
| 42 | Nymphe | 14.9 | | | | 43 | Weibchen | 8.9 |
| 44 | Männchen | 8.9 | | | | 44 | Männchen | 14.9 |
| 45 | Nymphe | 20.9 | | | | | | |
| 46 | Weibchen | 20.9 | | | | | | |
| 47 | Nymphe | 27.9 | | | | | | |
| 48 | Weibchen | 10.8 | | | | | | |
| 49 | Weibchen | 27.9 | | | | | | |
| 50 | Weibchen | 27.9 | | | | | | |
| 51 | Nymphe | 27.9 | | | | | | |
| 52 | Nymphe | 20.9 | | | | | | |
| 53 | Nymphe | 20.9 | | | | | | |
| 54 | Nymphe | 27.9 | | | | | | |

Tabelle 3.2 zeigt die als Positivkontrolle verwendeten Referenzstämme. *B. afzelii*, *B. garinii* (Osp-Typ6), *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. valaisiana* wurden von Dr. A. Schönberg, Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin, und *B. garinii* (Osp-Typ4) durch Dr. V. Fingerle Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt.

Tab. 3.2 Referenzstämme

| Genospezies | Serovare | Nummer | Isolation |
|-------------------------------------|----------------|---------------|-----------------------|
| <i>B. burgdorferi sensu stricto</i> | OspA-Serotyp 1 | 35B808 | <i>Ixodes ricinus</i> |
| <i>B. afzelii</i> | OspA-Serotyp 2 | 61BV1 | EM (Mensch) |
| <i>B. garinii</i> | OspA-Serotyp 4 | Pki | CSF(Mensch) |
| <i>B. garinii</i> | OspA-Serotyp 6 | 1B29 | <i>Ixodes ricinus</i> |
| <i>B. valaisiana</i> | | 104BA | <i>Ixodes ricinus</i> |

3.3.2 Nüchterne Zecken

Die Freilandfänge von ungesogenen Zeckenstadien erfolgten im Juni und Juli 2002 mittels Flaggmethode an Wald- oder Wegrändern mit Gebüsch oder hohem Gras, da an diesen Orten aufgrund der mikroklimatischen Bedingungen die meisten Zecken zu erwarten sind.

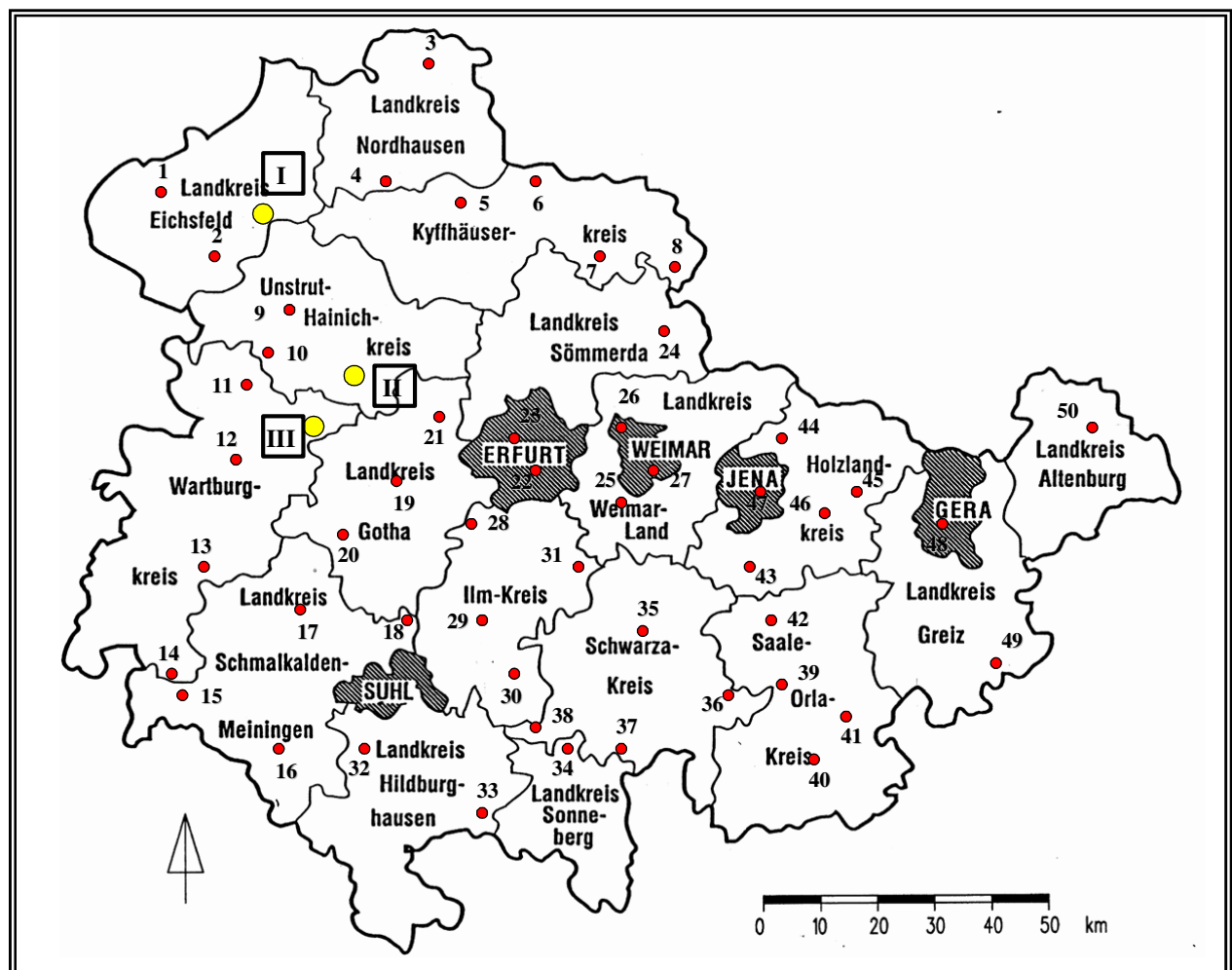


Abb. 3.1 Fangorte der Zecken, Vögel und Kleinsäuger. Rot markiert sind die Zeckenfangorte und gelbe Punkte kennzeichnen die Vogelfanggebiete. Punkt 31 ist das Kleinsäugetierfangebiet.

Die 50 ausgewählten Flächen waren vorwiegend Waldgebiete. Zum Teil handelte es sich auch um Park- oder Gartenanlagen. Bei der Auswahl der untersuchten Flächen wurde besonderer Wert auf Wander- und Naherholungsgebiete oder touristische Ausflugsziele gelegt. Außerdem wählten wir Fanggebiete in der Nähe von Krankenhäusern und Gartenanlagen, um Gebiete zu charakterisieren in denen mit einem hohen Personenaufkommen zu rechnen ist (Abb. 3.1). Die freilandgefangenen Zecken wurden nach Entwicklungsstadien getrennt, einzeln in sterile Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert oder bei -80 °C eingefroren.

3.3.3 Kleinsäuger

3.3.3.1 Untersuchungsgebiet

Zur Charakterisierung der Reservoirtierrolle der Kleinsäuger wurden in einem ausgewählten Habitat Thüringens über drei Vegetationsperioden (April bis Oktober 2001, 2002 und 2004) die im Folgenden aufgeführten Untersuchungen durchgeführt (Abb. 3.; Punkt 31).

Als Fangfläche wählten wir ein Gebiet mit Waldsaumstrukturen aus, das durch langjährige eigene Untersuchungen hinsichtlich des saisonalen Dichteverhaltens von *I. ricinus* und seiner Durchseuchungsrate mit *B. burgdorferi* s. l. sehr gut bekannt ist und über die gesamte Vegetationsperiode hinweg ausreichend hohe *I. ricinus* Fangzahlen garantiert (Dorn et al., 1999, Dorn und Sünder, 1995, Steil, 2002).

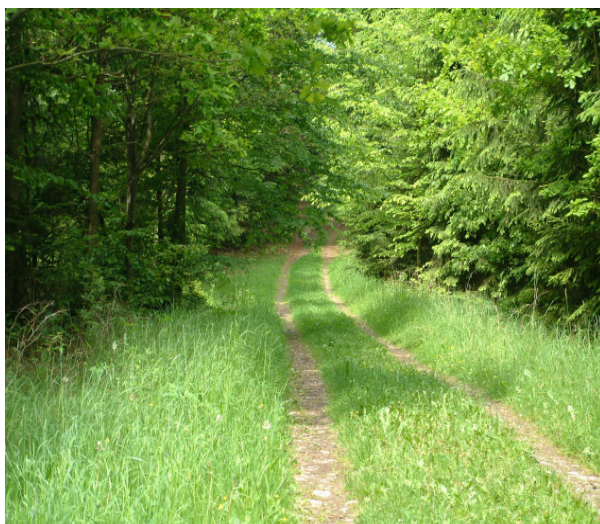


Abb. 3.2 Fanggebiet der Kleinsäuger in Bad Berka

Bei diesem Habitat handelt es sich um zwei Wegränder mit einem Wiesensaum, Gebüschmantel und anschließendem Übergang zu einem forstwirtschaftlich genutzten Nadelgehölzforst aus Fichten und Kiefern in der Nähe der Klinik in Bad Berka im Landschaftsschutzgebiet „Mittleres Ilmtal“ (Abb. 3.2). Im Gras- und Buschbereich und in den angelegten Jungforsten finden die Kleinsäuger ideale Lebensbedingungen.

3.3.3.2 Fang und Probenentnahme

Die Kleinsäuger wurden 1-2x je Saisonzeit 2001, 2002 und 2004 an drei bis vier aufeinanderfolgenden Tagen in 50 Oos-Drahtgitterfallen (Lebendfallen) mit Wippe und Nestkasten aus Holz gefangen. Im Jahr 2004 fand der Fang im Rahmen der Diplomarbeit von Jan Franke statt. Hier wurden „Ugglan - Special 1“ - Lebendfallen (GRAHNAB, Marienholm, Schweden) für den Fang benutzt. Beide Fallentypen eignen sich für den Fang von *M. arvalis*, *M. agrestis*, *M. glareolus*, *A. flavicollis*, *A. sylvaticus*.

Das Aufstellen der Fallen erfolgte beködert (Sonnenblumenöl mit Haferflocken und Apfelstücken) und mit Nistmaterial ausgestattet am Vorabend der jeweiligen Fangperiode in der Vegetation entlang des Weges im Abstand von 5m. In den Folgetagen wurden sie einmal täglich überprüft. Gefangene Kleinsäuger wurden nach der Geschlechts- und Artbestimmung vor Ort in einem großen Glas, das in Diethylether getränkten Zellstoff enthält, narkotisiert. Waren die Kleinsäuger betäubt, folgte die Blutentnahme am retroorbitalen Gefäßplexus mit einer Pasteur-Pipette. Die ca. 100-300µl Blut wurden in gekühlte sterile Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurde mittels einer sterilen 4mm starken Biopsienadel Ohrbiopsiematerial entnommen. Es schloss sich das Zählen aller sichtbaren und Absammeln aller gesogenen Zeckenstadien an, die, im Labor sortiert, in separaten Reaktionsgefäßen bei -80°C aufbewahrt wurden. Die Blutproben wurden nach der Entnahme maximal über Nacht bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (10000 x g; 10min; RT) und die Überstände vorsichtig in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Seren und Biopsieproben wurden bei -20°C gelagert.

3.3.4 Vögel

3.3.4.1 Untersuchungsgebiete

Die während dieser Arbeit untersuchten Vögel wurden im Rahmen des deutschlandweiten Singvogelmonitorings gefangen (<http://www.riparia.de/ims1.htm>). Ziel dieser Studie ist eine langjährige Bestandsaufnahme von Singvogelpopulationen. Von den fünf Flächen in Thüringen die am Singvogelmonitoring teilnehmen, konnten drei in die Untersuchung einbezogen werden

(Abb. 3.3-3.5). Fläche I in Reifenstein (Eichsfeld/Nordthüringen) liegt an einem Klärteich mit Gebüschland und ist umgeben von einem Buchenmischwald. Fläche II bei Steinberg und Fläche III bei Hütscheroda liegen in der Nähe des Nationalpark Hainich, einem Buchenbestand am Westrand des Thüringer Beckens (Abb. 3.1). Beide Gebiete sind Gebüschland. Auf allen drei Flächen konnte über viele Jahre ein großes Spektrum an Singvögeln dokumentiert werden.



Abb. 3.3 Untersuchungsgebiet Reifenstein



Abb. 3.4 Untersuchungsgebiet Hütscheroda



Abb. 3.5 Untersuchungsgebiet Steinberg bei Zimmern



Abb. 3.6 Zeckenentnahme bei einem Rotkehlchen (Fotos: Andreas Goedecke)

3.3.4.2 Fang und Zeckenentnahme

Die Freilanduntersuchungen wurden in den Jahren 2004/2005 durchgeführt. Für die Netzfänge wurden 6m lange und 3m hohe Japannetze mit einer Maschenweite von 3cm verwendet. Fänge wurden je einmal jährlich für 10 Wochen durchgeführt, wobei die Netze täglich für 6 h geöffnet waren. Auch außerhalb des Singvogelmonitorings gefangene Vögel wurden in die Untersuchung mit einbezogen. Nach dem Fang erfolgte die Bestimmung der Artzugehörigkeit, des Alters und des Geschlechts. Anschließend wurden alle sichtbaren Zecken entfernt (Abb. 3.6) und in Reaktionsgefäße mit Grashalm überführt um eine

ausreichende Luftfeuchte zu gewährleisten. Bis zur Bearbeitung wurden die Zecken bei 4°C gelagert.

3.3.5 Patientenzecken

Die von Thüringer Ärzten abgesammelten Patientenzecken wurden tiefgekühlt abgeholt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4 Mikrobiologische Methoden

3.4.1 Kultivierung

Borrelienstämme

Die in der stationären Phase eingefrorenen Kulturen wurden aufgetaut und 100µl steril in ein mit 6ml BSK-H-Medium befülltes Falconröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden bei 32,7°C bebrütet. Nach einer Woche wurden die Kulturen im Dunkelfeld kontrolliert und erneut überimpft.

Hautbiopsieproben

Die Hautproben wurden mit 70%igem Alkohol abgerieben und anschließend in sterilem PBS-Puffer gewaschen. In sterilen Reaktionsgefäßen wurden die Proben mittels Mikropistill mechanisch zerkleinert und in Falconröhrchen mit BSK-H-Medium überführt. Die Bebrütung erfolgte ebenfalls bei 32,7°C. Als Hemmstoff für die Begleitflora wurde Neomycin in einer Konzentration von 30µg/ml zugegeben. Die Kontrolle im Dunkelfeld erfolgte wöchentlich.

3.4.2 Dunkelfeldmikroskopie

Zur wöchentlichen Kontrolle der Kulturen oder bei Farbänderung des Mediums von rot nach gelb wurden die Röhrchen mittels Dunkelfeldmikroskopie auf Spirochäten untersucht. Zu diesem Zweck wurde steril mittels Pipette ein Tropfen der Kultur auf einen Objektträger gegeben und im Dunkelfeldmikroskop bei 400facher Vergrößerung gemustert. Gut bewachsene Kulturen wurden bei -80°C eingefroren oder sofort für weitere Untersuchungen genutzt.

3.4.3 Zellzahlbestimmung von Bakterienkulturen

Da Borrelien auf festem Medium nicht in Kolonien wachsen und damit keine Quantifizierung erlauben, erfolgte die Bestimmung der Bakterienzahl mit Hilfe des Immunofluoreszenstests (IFT). Dazu wurden Kulturen in der stationären Phase (Farbumschlag nach gelb) abzentrifugiert und das Pellet in 1ml PBS resuspendiert und homogenisiert. Dieser Schritt wurde zum Auswaschen des Mediums zweimal wiederholt. Nach dem Herstellen verschiedener Verdünnungsstufen, wurden jeweils 10µl Zellsuspension auf ein Objektträgerfeld gegeben. Für jede Verdünnungsstufe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Objektträger wurden anschließend getrocknet und im Acetonbad für 10min bei -20°C entfettet. Daran schloss sich der IIFT (Kap. 3.3.4) an. Die Zellzahlbestimmung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es wurde jeweils das ganze Feld einer Verdünnung ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Bakterien / ml} = \text{Zellzahl} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 100$$

Das benötigte Volumen der Bakteriensuspension wurde zentrifugiert (4000 x g; 5min, RT) und das Sediment zur Einstellung des erforderlichen Titors in der entsprechenden Menge Medium resuspendiert.

PBS-Puffer: pH: 7,2

| | |
|----------------------------------|-----------|
| NaCl | 8,00g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,20g |
| KCl | 0,20g |
| Na ₂ HPO ₄ | 2,90g |
| MgCl ₂ | 1,02g |
| aqua bidest. | ad 1000ml |

3.5 Indirekter Immunofluoreszenstest (IIFT)

3.5.1 Probenvorbereitung

Der Immunofluoreszenztest, der auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion beruht, dient den direkten Borreliennachweis in Zecken. Die gefangenen Zecken wurden je 5min in Petrischalen mit 70%igen, 50%igen und 30%igen Alkohol gereinigt und desinfiziert und anschließend in sterilem PBS-Puffer gewaschen. Die Zecke wird auf eine Tüpfelplatte in 30µl PBS-Puffer überführt, mit Hilfe zweier Skalpelle der Hinterleib (abdomen) geöffnet und der Darminhalt

mittels Pipette auf einen Objektträger gegeben. Nymphen werden auf der Tüpfelplatte mit einem Glasstab zermörsert. Die Suspension wurde unverdünnt gleichmäßig auf die Felder eines Objektträgers verteilt. Die Objektträger werden nach Lufttrocknung 10min in Aceton bei -20 °C fixiert und bis zum Test bei -20 °C in Alufolie verpackt aufbewahrt.

3.5.2 Durchführung des IIFT

Zur Begutachtung wurden die Präparate mit je Feld mit 15µl eines Kaninchen-anti-Borrelien-Konjugates in einer Gebrauchsverdünnung von 1:150 beschichtet. Anschließend erfolgte eine 60min Inkubation in der feuchten Kammer bei 37 °C. Die Objektträger wurden dann 3x in PBS-Puffer gewaschen. Auf die getrockneten Felder wurden 15µl fluoresceinmarkierten Ziege-Anti-Kaninchen IgG-Konjugat (1:150) aufgetragen und wieder für 60min in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte fanden ebenfalls im Dunkeln statt. Es folgten wie beim ersten Konjugat drei Waschschrte im PBS-Puffer und Lufttrocknung. Die Objektträger wurden mit Glycerinpuffer (Einbettungsmedium) beschickt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und in einem abgedunkelten Raum im Auflicht-Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Zur Kontrolle wurden in jeder Reihe mehrer positive und negative Kontrollen mitgeführt. Als Positivkontrolle diente ein von Dr. Schönberg (BgVV, Berlin) zur Verfügung gestellter *B. garinii* Stamm 1B 29 (siehe Tab. 3.2). Die Negativkontrolle war PBS-Puffer. Nur eine deutliche Fluoreszenz mit erkennbarer Schraubenform wurde als positiv anerkannt.

3.6 Untersuchung der Mäuseseren im IFAT

Für die serologische Untersuchung der Kleinsäuger wurde ebenfalls der IFT verwendet. Die Beschichtung der Objektträger erfolgte analog zur Beschichtung der Zeckenpräparate (Kap 3.4.1). Aufgetragen wurde eine auf 10-15 Borrelien pro Gesichtsfeld eingestellte (Kap. 3.3.3) Kultur.

Zur Serumgewinnung wurde das Kleinsäugerblut bei 10000 x g für 10min bei RT zentrifugiert und das Serum abgenommen. Die Seren wurden 1:16 (10µl Serum + 150µl PBS), 1:32 (50µl der 1:16-Verdünnung + 50µl PBS) und nach dem gleichen Prinzip 1:64, 1:128, 1:256, 1:512 und 1:1024 in Mikrotiterplatten verdünnt. Mit der größten Verdünnungsstufe beginnend (1:1024) wurden je Stufe 10µl auf die mit der Kultur beschichteten Objektträgerfelder aufgetragen. Es wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt (Positivserum und Negativserum). Anschließend erfolgte die Inkubation der Objektträger in einer feuchten Kammer für 60 Minuten bei 37° C. Danach wurden die Proben 3 x 5min mit PBS gewaschen und anschließend getrocknet. Als Konjugat wurde FITC-konjugiertes Kaninchen-anti-Maus IgG in einer

Verdünnung von 1:50 verwendet. Es folgte wieder eine Inkubation von 60 Minuten bei 37°C und die Waschschritte im PBS-Puffer unter Lichtausschluss. Im Anschluss an den Trocknungsvorgang wurde wie bei den Zeckenpräparaten eingebettet. Die Beurteilung erfolgte bei 1000facher Vergrößerung. Das Endergebnisse war die höchste Verdünnungsstufe des Serums bei der die Reaktion noch als positiv bewertet wurde (= Antikörpertiter). Ab einem Titer von 1:32 wurde die Probe als positiv bewertet.

3.7 Präparation der DNA

3.7.1 DNA Extraktion aus Borrelienkulturen

Eine einheitliche und sichere Methode für die Isolierung und Reinigung von DNA ist die Präparation mit Hilfe eines speziellen Kits von QIAGEN (Dneasy-Tissue Kit). Dieser beruht auf dem Prinzip der selektiven Bindung von Nukleinsäuren an Silikagel-Membranen in Kombination mit Wasch- und Elutionsschritten. 100µl einer gut bewachsenen Kultur wurden für 1min bei 14000U/min abzentrifugiert und das Pellet in 180µl ATL-Puffer und Proteinase K gelöst und bei 55°C für 3h inkubiert. Nach Zugabe des Puffers AL, 10minütiger Inkubation bei 55°C und Zugabe von 200µl 100% Ethanol erfolgte die Übertragung des Gemisches auf die Säule. Die Pufferbedingungen ermöglichen eine optimale Bindung der durch die Proteinase freigesetzten DNA an die Silikagelmembran. Mittels zweier Waschschritte mit Waschpuffern werden dann andere störende Bestandteile entfernt. Mit Hilfe des AE-Puffers wird anschließend die DNA wieder in Lösung gebracht. Dazu werden 200µl Puffer auf die Säule gegeben und nach 1-5 min Wartezeit bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Die auf diese Weise gewonnenen DNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung entweder für wenige Tage im Kühlschrank bei 4°C oder für mehrere Wochen bei -20°C in den Auffanggefäßen aufbewahrt.

3.7.2 DNA-Extraktion aus nüchternen Zecken

Die Extraktion der DNA aus Zecken beginnt mit der mechanischen Zerkleinerung der Zecken. Nach Zugabe von 180µl Lysepuffer und Proteinase K wurden die Zecken steril mittels Mikropistill in den Reaktionsgefäßen zermörsert und für 3h bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde durch Vortexen die Lösung homogenisiert. Größere Zeckenbestandteile (Chitinpanzer) wurden steril entfernt. Alle weiteren Schritte wurden analog zur Extraktion aus Kulturen durchgeführt. Zur Elution der DNA von der Säule wurde nur eine Menge von 60µl AE-Puffer eingesetzt, da so eine höher konzentrierte Ausgangslösung für die PCR erreicht werden kann.

3.7.3 DNA-Extraktion aus gesogenen Zecken –Validierung der DNA-Extraktion

Für die Untersuchung der gesogenen Zecken wurden die Methoden modifiziert um bessere Ergebnisse zu erzielen. Erste Untersuchungen zeigten, dass der für die nüchternen Zecken verwendete Dneasy-Tissue Kit nicht die gewünschten Ergebnisse bei den gesogenen Zecken zeigte. Die meisten Arbeitsgruppen testen und validieren einzig die PCR-Methode. Aber wie Schmidt et al (1997) bei der DNA-Extraktion aus Patientenmaterial zeigten, ist auch die Präparationsmethode entscheidend. Aus diesem Grund wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Jan Franke drei verschiedenen Extraktionsmethoden getestet. Zur Validierung wurden verschiedene Verdünnungen von Borrelien-Kulturen (Kap. 3.3.3) eingesetzt. Jede Verdünnungsstufe mit 10, 100 und 1000 Borrelien pro 10µl wurde zu einer negativen Zecke gegeben und mit Kleinsäugerblut versetzt und der jeweilige Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden mehrere Parallelproben untersucht. Getestet wurde neben dem DNeasy-Tissue Kit der PROMEGA Wizard Genomic DNA Purification Kit und der GenElute Bacterial Genomic DNA Kit von Sigma. Bei allen Kits erfolgte wieder die mechanische Zerkleinerung mittels Mikropistill. Eluiert wurde mit 60µl Elutionslösung.

3.7.4 DNA-Extraktion aus Biopsiematerial

Die in sterilen Tubes aufbewahrten Biopsieproben wurden mit dem GenElute Bacterial Genomic DNA Kit von Sigma aufgearbeitet. Die Probe wurden mit 180µl Lysis Solution und 40µl Proteinase K versetzt. Die Inkubation erfolgte aufgrund der Menge an Wirtsgewebe über Nacht. Nach der Inkubation wurde gründlich gemixt um das Gewebe vollständig aufzulösen. Alle weiteren Schritte erfolgten laut Hersteller. Die DNA-Proben wurden bis zur baldigen PCR bei 4°C aufbewahrt. Bei der PCR kamen 10µl zum Einsatz.

3.7.5 Erregernachweis mittels PCR-RFLP

Mit Hilfe der PCR können Bereiche der DNA, die in sehr geringen Mengen vorliegen, millionenfach amplifiziert werden. Voraussetzung hierfür sind Sequenzinformationen des 5´ und 3´ Endes des DNA-Stückes. Die Methode beruht im Wesentlichen auf einem Zyklus von Temperaturänderungen. Auf einen Denaturierungsschritt von 94°C, der die Doppelhelix aufspaltet, folgt eine spezifische Annealingtemperatur, bei der die Primer an homologe Bereiche der DNA binden. Eine anschließende Temperaturerhöhung auf 72°C ermöglicht der Taq-Polymerase die Synthese der komplementären Stränge mittels der zugesetzten dNTPs. Die DNA-Replikation mit Hilfe der nested-PCR zeigt eine höhere Sensitivität als die einfache PCR. Die nested-PCR zeichnet sich durch zwei aufeinander folgende Durchläufe mit

unterschiedlichen Ansätzen aus, wobei dem äußeren Ansatz ein innerer Ansatz folgt. An die PCR schließt sich die Behandlung des DNA-Stückes mit Restriktionsenzymen an. Bei der Restriktionsanalyse (**Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus**) werden die Nuklotidabschnitte mit Hilfe von Restriktionsenzymen spezifisch geschnitten und mittels Gelelektrophorese auf Größenunterschiede untersucht. Anhand entstehender Bandenmuster kann die DNA von unterschiedlichen Organismen differenziert werden.

3.7.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) der 5S-23S rRNA -Region

Der Nachweis der Borrelien-DNA erfolgte über die Amplifizierung der 5S-23S rDNA Region nach Rijpkema et al. (1997). Diese Methode ist eine von vielen Arbeitsgruppen angewandte Technik. Das rRNA-Genmuster der meisten *B. burgdorferi* s. l. Stämme enthält je zwei Kopien der 23S rRNA (*rrlA*) und der 5S rRNA (*rrfA*) auf dem linearen Chromosom lokalisiert. Die Primer dieser nested PCR, 23SN1; 23SC1; 23SN2 und 5SCB, bei der sich an die erste PCR eine zweite anschließt, amplifizieren ein ca. 225 bp langes DNA-Molekül.

Tab. 3.3 Primer für die Amplifikation des 5S-23S- rRNA Region von *B. burgdorferi* s. l.

| Primer | | Sequenz 5'-3' |
|----------------------|-------|----------------------------|
| Primäramplifizierung | 23SN1 | ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC |
| | 23SC1 | TAAGCTGACTAATACTAATTACCC |
| Nested PCR | 23SN2 | ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA |
| | 5SCB | GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG |

Es wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

PCR-Ansatz:

- 10µl Template-DNA
- 10x „HotMaster Taq Buffer“ (pH 8,5)
- 25mM MgCl₂
- je 200mM dNTP
- je 10pmol Primer: 23SN1; 23SC1
- 0,25µl „HotMaster Taq-Polymerase“
- DEPC behandeltes aqua bidest. ad 50µl

„semi-nested“-PCR-Ansatz:

- 5µl Template-DNA
- 10x „HotMaster Taq Buffer“
- 25mM MgCl₂
- je 200mM dNTP
- je 100pmol Primer: 23SN2; 5SCB
- 1,25U „HotMaster Taq-Polymerase“
- DEPC behandeltes aqua bidest. ad 50µl

Um nichtspezifische Amplifikationen zu vermeiden, wurde eine touch-down PCR mit vereinfachtem Hot Start durchgeführt. Das Pipettieren des PCR-Master-Mix und die Zugabe der Probe fanden unter der Sterilbank auf Eis statt. Eine Negativ- (aqua bidest.) und Positivkontrolle (Referenzstamm) wurde bei jedem Ansatz mitgeführt.

Die Reaktionsbedingungen der äußeren und inneren PCR sind im folgenden Schema (Abb. 3.7) dargestellt:

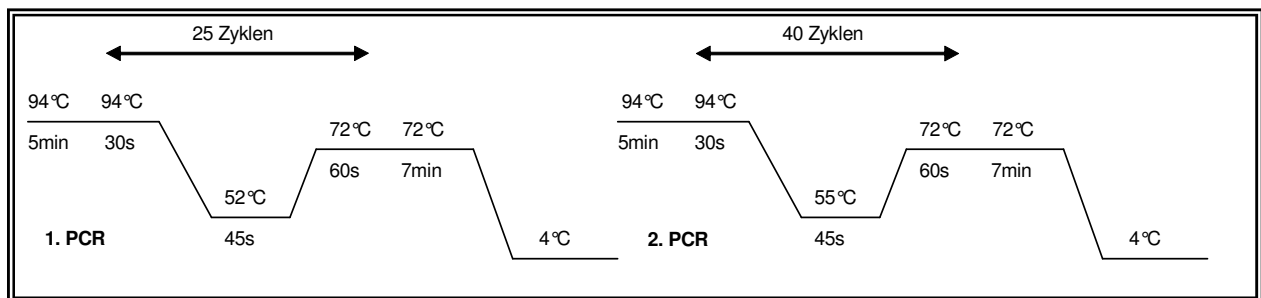


Abb. 3.7 Schematische Darstellung des Verlaufs der PCR der 5S-23S rRNA-Region

Nach der DNA-Amplifikation folgte die Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel, das anschließend mit Ethidiumbromid gefärbt und im Transilluminator sichtbar gemacht wurde. Alle positiven Proben wurden mittels RFLP mit den Enzymen MseI und DraI weiter untersucht.

3.7.7 Polymerase-Kettenreaktion des *OspA*-Gens

Bei dieser PCR wird ein ca. 800bp langes Fragment aus dem *OspA* - Gen vervielfältigt (Michel *et al.*, 2003). Dieses Gen ist bei allen Genospezies des *B. burgdorferi* s.l. - Komplexes vorhanden. Das Gen zeigt eine sehr große Heterogenität innerhalb der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. (WANG *et al.* 1999b) und erlaubt eine Differenzierung der verschiedenen *OspA*-Serotypen.

Tab. 3.4 Primer für die nested PCR des *OspA* Gens von *B. burgdorferi* s. l.

| Primer | | Sequenz 5'-3' |
|----------------------|-----|---------------------------------|
| Primäramplifizierung | V1a | GGG AAT AGG TCT AAT ATT AGC |
| | V1b | GGG GAT AGG TCT AAT ATT AGC |
| | R2 | CAT AAA TTC TCC TTA TTT TAA AGC |
| Nested PCR | V3a | GCC TTA ATA GCA TGT AAG C |
| | V3b | GCC TTA ATA GCA TGC AAG C |
| | R2 | CAT AAA TTC TCC TTA TTT TAA AGC |

Es wird eine „semi-nested“ PCR durchgeführt, welche aus einer Primäramplifizierung mit den Primern *V1a*, *V1b*, *R37* und *R2* sowie der „semi-nested“ PCR mit den Primern *V3a*, *V3b*, *R37* und *R2* besteht (Tab. 3.4). Mit *V1a*, *V1b*, *V3a* und *V3b* kommen Wobble – Primer zum Einsatz um auch, sich nur in einem Basenpaar unterscheidende Stämme, zu erfassen. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3' Orientierung angegeben.

PCR-Ansatz:

- 10µl DNA-Probe
- 10x „HotMaster *Taq* Buffer“ (pH 8,5)
- 25mM MgCl₂
- je 200mM dNTP
- je 10pmol Primer: *V1a*, *V1b*, *R2*, *R37*
- 0,25µl „HotMaster *Taq*-Polymerase“
- DEPC behandeltes aqua bidest. ad 50µl

„semi-nested“-PCR-Ansatz:

- 5µl Template-DNA
- 10x „HotMaster *Taq* Buffer“
- 25mM MgCl₂
- je 200mM dNTP
- je 100pmol Primer: *V3a*, *V3b*, *R2*, *R37*
- 1,25U „HotMaster *Taq*-Polymerase“
- DEPC behandeltes aqua bidest. ad 50µl

Bei der Primäramplifikation werden je einmal die Primerkombinationen *V1a*, *V1b*, *R2*, *R37* sowie *V3a*, *V3b*, *R2*, *R37* verwendet. Für jede PCR wird jeweils eine DNA-Probe eines *B. burgdorferi* Referenzstammes als Positivkontrolle und steriles aqua bidest. als Negativkontrolle eingesetzt. Auf einen initialen Denaturierungsschritt von 2min bei 94 °C folgen 30 Zyklen nach den in der folgenden Abbildung 3.8 dargestellten Reaktionsbedingungen.

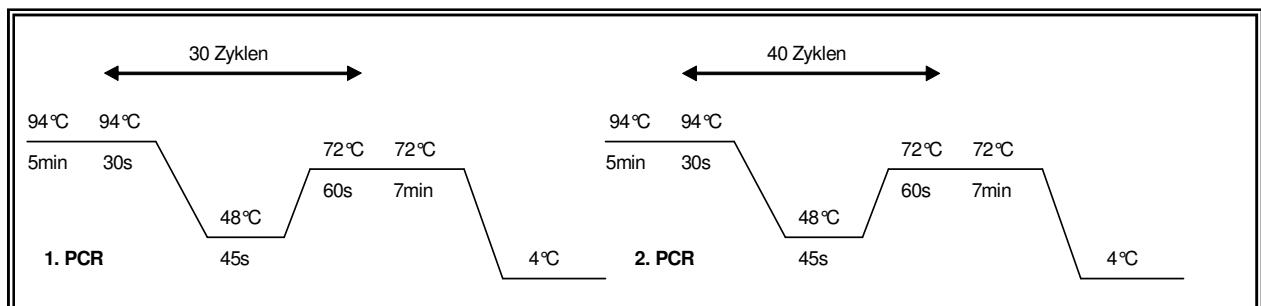


Abb. 3.8 Schematische Darstellung des Verlaufs der PCR des *OspA*-Gens

3.7.8 Agarosegelelektrophorese

Zur Trennung und Analyse von DNA-Fragmenten wurde die horizontale Gelelektrophorese angewandt. Diese Methode beruht auf der Tatsache, dass DNA bei alkalischem pH-Wert aufgrund des deprotonierten Zuckerphosphatrückgrades als Anion vorliegt und sich somit in einem elektrischen Feld auf die Anode hin zubewegt.

In der vorliegenden Untersuchung wurden Agarosegele mit einer Konzentration von 2% verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in 1xTBE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle durch mehrmaliges Aufkochen geschmolzen. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wird sie in die vorbereitete Gelkammer gegossen, in die ein Kamm zur Probenaussparung eingesetzt wurde. Nach Erhärten wird das Gel in die mit 1xTBE gefüllte Gelkammer eingesetzt. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wird ein Längenstandard bekannter Bandengrößen aufgetragen. Die Proben werden vor dem Auftragen 1:5 mit Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei 60V für 3h, wenn durch Restriktionsendonukleasen gespaltene DNA aufgetrennt werden soll, ansonsten 1h. Nach Beendigung der Elektrophorese wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml) für 20min gefärbt und auf dem UV-Transilluminator (254nm) auf Banden untersucht oder mittels Geldokumentationssystem (Fluor-STM Multiimager von Bio-Rad) fotografiert und digital abgespeichert.

10xTBE

| | |
|--------------|-----------|
| Tris | 109g |
| Borsäure | 55,64g |
| EDTA | 9,31g |
| aqua bidest. | ad 1000ml |

3.7.9 Restriktionsanalyse der Amplifikate

Restriktion der 5S-23S-rRNA-Region

Ist nach der PCR eine Bande bei 225bp vorhanden, werden je 10µl des PCR-Produktes mit 5U des Restriktionsenzym MseI verdaut. Die Verdauungsansätze (DNA, Verdauungspuffer, Restriktionsendonuklease) werden für 1-2 h bei 65°C inkubiert.

Für die Analyse der Restriktionen werden 10µl aus dem Ansatz entnommen, mit Probenpuffer versetzt und auf ein 20% Acrylamidgel in TBE-Puffer aufgetragen. Anschließend wird das Gel in Ethidiumbromid gefärbt. Die Auswertung und Dokumentation der mit Ethidiumbromid gefärbten RFLP-Gele erfolgt am Geldokumentationssystem.

Die Auswertung der Gele erfolgt durch grafisches Auftragen der Marker-DNA gegen die Laufstrecke. Anhand dieser Grafik kann die Größe der Restriktionsfragmente bestimmt werden. Die Größe der Fragmente gibt nun Auskunft über die vorhandene Genospezies (Postic et al. 1995, Rijpkema et al. 1997). Als Vergleich dienen auch die Positivkontrollen.

Restriktion des *OspA*-Gens

OspA-positive Proben wurden zur Identifikation der *B. burgdorferi* s.l. –Genospezies mit den Enzyme HindIII, BglII, Kpn2I, SspI und SfiI geschnitten. Jeder *OspA*-Serotyp besitzt auf dem *OspA*-Gen spezifische Schnittstellen, die eine Charakterisierung ermöglichen. Zur Hydrolyse der DNA werden in separaten 0,2ml Reaktionsgefäßen 2U Enzym eingesetzt und über Nacht abhängig vom verwendeten Enzym in dem vom Hersteller empfohlenen enzymespezifischen Reaktionspuffer bei der in Tabelle 3.5 angegebenen Temperatur inkubiert. Die Enzymmenge sollte nicht mehr als 1/10 des Reaktionsvolumens betragen, da das zur Lagerung des Enzyms benötigte Glycerin die Enzymaktivität verändern kann, wenn es in zu hoher Konzentration vorliegt. Nach der Reaktion werden die Proben mittels Gelelektrophorese ebenfalls auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt.

Beispiel für einen Restriktionsansatz:

| | |
|---------------------|---------|
| DNA-Lösung | 7µl |
| Enzym (10 units/µl) | 0,5µl |
| Puffer (spezifisch) | 2µl |
| BSA (10 µg/µl) | 0,12µl |
| aqua bidest. | ad 20µl |

Tab. 3. 5 Schnittstellen und Temperaturoptimum der Restriktionsenzyme

| Enzym | BglII | SfiI | SspI | HindI | Kpn2I |
|---------------|---------|---------|---------|--------|---------|
| Schnittstelle | A↓GATCT | TT↓CGAA | AA↓TATT | AA↓GCT | T↓CCGGA |
| Temp in °C | 37 | 37 | 37 | 37 | 55 |

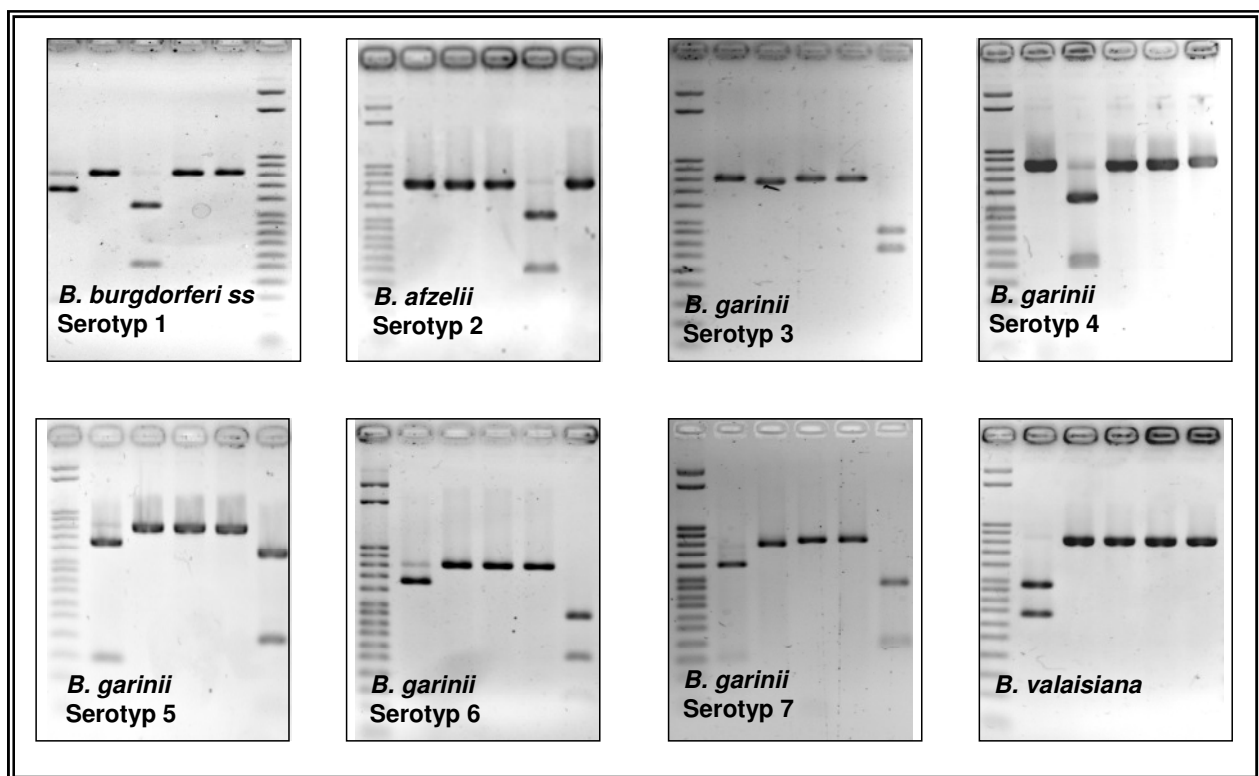
↓ markiert den charakteristischen Restriktionsort des jeweiligen Enzyms

3.7.10 Detektion und Analyse der Fragmentstücke

Anhand des aufgetragenen DNA-Längenstandards kann die Größe der Fragmentstücke der einzelnen Verdauungsansätze bestimmt werden und mittels der in Tabelle 3.6 dargestellten Schnittgrößen und der daraus resultierenden Bandenmuster (Abb. 3.9) können die Genospezies und der *OspA*-Serotyp ermittelt werden. Die Bestimmung der in Tabelle 3.6 dargestellten Fragmentgrößen erfolgte anhand der Sequenzen einer Vielzahl von in NCBI-BLAST eingestellten Stämmen von *B. burgdorferi* s. l. durch theoretische Restriktion (Michel et al., 2003).

Tab. 3.6 Theoretische Fragmentgrößen der PCR-RFLP des *OspA*-Gens nach Michel et al., 2003

| Spezies | OspA-Typ | Hind III | Bgl II | SspI | Sfu | Kpn 2I |
|--------------------------|----------|----------|---------|---------|---------|-------------|
| <i>B. burgdorferi</i> ss | 1 | 668/150 | 818 | 551/267 | 818 | 818 |
| | 1 | | | | | 438/380 |
| <i>B. afzelii</i> | 2 | 818 | 818 | 818 | 550/268 | 818 |
| <i>B. garinii</i> | 3 | 818 | 773/45 | 818 | 818 | 438/380 |
| | 4 | 818 | 570/248 | 818 | 818 | 818 |
| | 5 | 668/150 | 818 | 818 | 818 | 564/197/57 |
| | 6 | 668/150 | 818 | 818 | 818 | 438/254/126 |
| | 7 | 668/150 | 773/45 | 818 | 818 | 438/380 |
| | 7 | | | | | 438/197/183 |
| <i>B. valaisiana</i> | | 477/341 | 818 | 818 | 818 | 818 |

**Abb. 3.9** Restriktionsmuster der verschiedenen *OspA*-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l.

3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

3.8.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Gewinnung der Gesamtzellproteine von *B. burgdorferi* s. l. wurden 5ml einer sich im exponentiellen Wachstum befindlichen Kultur zentrifugiert (4000 x g; 30min; RT) und das Pellet in 5ml Tris-HCl-Puffer aufgenommen und gevortext. Anschließend wurde nochmals zentrifugiert und das Pellet in 100µl Tris-HCl-Puffer aufgenommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt.

| | |
|------------------------|-----------|
| <u>Tris-HCl-Puffer</u> | pH 7,4 |
| Tris-HCl | 61g |
| aqua bidest. | ad 1000ml |

Zur **Proteinbestimmung** wurden 20µl Proteinlösung mit 1000µl Bradford-Reagenz gemischt und die Extinktion nach 5min bei 595 nm am Spektrometer gemessen. Die Herstellung des Reagenz erfolgte nach Bradford (1976). Aus einer vorher mit Rinderserumalbumin erstellten Eichkurve lässt sich der Wert in µg Protein/100µl Lösung ablesen. Die Konzentration der Lösung wurde auf 0,5µg Protein/1ml Probe eingestellt.

Bradford-Reagenz (dunkel lagern)

| | |
|--------------------------|------------|
| Coomassie Brilliant Blue | |
| G-250 | 100 mg |
| 95% Ethanol | 50 ml |
| 85% Phosphorsäure | 100 ml |
| aqua bidest. | ad 1000 ml |

3.8.2 Acrylamidgelelektrophorese

Für die **SDS-Gelelektrophorese** werden 30µl jeder Probe mit 10µl Probenpuffer (SDS, β-Mercaptoethanol, Glycerol, Bromphenolblau) gemischt und für 5min bei 100°C im Wasserbad denaturiert. Durch die Denaturierung und Anlagerung von SDS wird erreicht, dass alle Proteine die gleiche Struktur und Ladung aufweisen und so nach der Größe aufgetrennt werden. Nach der Inkubation werden die Proben sofort auf Eis gestellt und möglichst schnell auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Hierfür wird eine Midi-Gelapparatur verwendet. Die verwendeten Trenngele haben immer eine Polyacrylamidkonzentration von 12%. Das Sammelgel war 5%-ig. Tabelle 3.7 zeigt die Zusammensetzung der Gele.

Tab. 3.7 Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels (2 Gele)

| | Gel 30 | Puffer | aqua bidest. | SDS | APS | TEMED |
|-----------|---------------|---------------|---------------------|------------|------------|--------------|
| Trenngel | 13ml | 8ml | 18,5ml | 0,2ml | 0,2ml | 0,04ml |
| Sammelgel | 1,3ml | 2,5ml | 6,2ml | 0,05ml | 0,08ml | 0,02ml |

Acrylamid-Stammlösung (30 %):

| | |
|---------------------------|----------|
| Acrylamid | 30g |
| N,N'-Methylenbisacrylamid | 8g |
| aqua bidest. | ad 100ml |

Sammelgelpuffer (SGP):

| | |
|----------|------------|
| | pH 6,8 |
| Tris-HCl | 750mM |
| SDS | 0,6% (w/v) |

Trenngelpuffer (TGP):

| | |
|----------|-------------|
| | pH 8,8 |
| Tris-HCl | 1,8M |
| SDS | 0,48% (w/v) |

Elektrodenpuffer 10X

| | |
|--------------|-----------|
| | pH 8,3 |
| Glycin | 288g |
| Tris-HCl | 60g |
| aqua bidest. | ad 2000ml |
| SDS | 20ml |

Das Trenngel wird nach Fertigstellung mit Butanol überschichtet, welches nach der Polymerisation vollständig entfernt wird. Auf das Trenngel wird das Sammelgel aufgetragen, in das der Kamm eingesetzt wurde. Durch den so geschaffenen diskontinuierlichen Übergang von einem pH-Wert zum anderen werden die Banden verschärft. Nach Entfernung des Kammes wird das Gel in die Apparatur eingesetzt und der Elektrodenpuffer eingefüllt. Begonnen wird die Elektrophorese mit einer Spannung von 60V, die auf 90V erhöht wird, wenn die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten. Der Lauf wird nach ca. 5cm Laufstrecke beendet. Als Marker wird ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker (Prestained SDS-Molecular Weight Markers, Sigma; 7B) verwendet.

3.8.3 Detektion und Analyse der Proteine

Zum Anfärben der Banden wurde das Gel für ca. 2h in einer Färbelösung inkubiert und zur Verringerung der Hintergrundfärbung über Nacht in einer Entfärbelösung gelagert. Die Gele wurden zur besseren Bearbeitung eingescannt. Für die Auswertung der Gele wurden die Markerproteine gegen die Laufstrecke graphisch aufgetragen und anhand des berechneten Anstiegs die Größe der unbekannten Proteine bestimmt. Die Größen der wichtigsten, für *B. burgdorferi* s. l. typischen Proteine sind hinreichend in der Literatur beschrieben (Hauser et al. 1999, Kurtenbach et al. 1994, Hovius et al. 2000).

Färbelösung:

| | |
|---------------------|-------|
| Coomassie Brilliant | |
| Blue G-250 | 1g |
| Essigsäure | 70ml |
| Methanol | 300ml |

Entfärbelösung

| | |
|--------------|-----------|
| Essigsäure | 70ml |
| Methanol | 300ml |
| aqua bidest. | ad 1000ml |

3.9 Sequenzanalyse

Von den positiven Proben der nested PCR des *OspA*-Gens von *B. burgdorferi* s. l. erfolgt für eine repräsentative Auswahl die Sequenzierung mittels Kettenabbruchverfahren (Didesoxymethode) nach Sanger. Diese beruht auf einer enzymatisch gesteuerten Replikation eines DNA-Stranges und einem Kettenabbruch, welcher durch je eine der vier basenanalogen Didesoxynucleotide (ddNTPs) ausgelöst wird, da das weitere Wachstum der Kette blockiert wird. Aus dem bei der Gelelektrophorese durch die entstehenden Fragmente gebildeten Bandenmuster der vier Reaktionsansätze kann die Sequenz abgelesen werden.

3.9.1 Sequenzierung des *OspA*-Gens

Zur Sequenzierung des *OspA*-Gens wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide verwendet. Die durch den Kettenabbruch entstandenen Fragmente wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und lasergestützt abgelesen. Das bei der PCR entstandene Produkt wird mit dem High Pure PCR Produkt Purifikation Kit gereinigt und kann so direkt für die Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden. In einem Reaktionsansatz befinden sich 100ng des DNA-templats in Form des gereinigten PCR Produktes, je 5µl der Primer *V3a*, *V3b* und *R2* und 4µl des Big Dye ABI PRISM, welches die Polymerase, Nukleotide, je ein fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotide (ddNTPs), Puffer und $MgCl_2$ enthält. Da vier verschiedene Farbstoffe verwendet werden, kann ein Reaktionsansatz verwendet werden. Nach 30s thermischer Denaturierung bei 96°C fand die Sequenzierungsreaktion nach dem in Abbildung 3.10 dargestellten Schema im ABI Prism 377 DNA Sequencer statt. Es folgte eine Ethanol-fällung der markierten DNA-Fragmente. Nach der Sequenzierung wurden die Produkte von überschüssigen Reaktionskomponenten gereinigt und volumenmäßig gefällt. Der komplette Ansatz wurde mit 50µl 95% Ethanol und 2µl 3M Natrium-Acetat pH 5,2 10min gefällt und danach bis zur Pelletierung zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und durch Zentrifugation erneut pelletiert. Das bei 50°C getrocknete Pellet wurde in Template Suppression Reagent ABI PRISM aufgenommen und ist nach 2-minütiger Denaturierung bei 90°C bereit für die Injizierung in die Kapillar-Elektrophorese, einem

hochauflösenden Sequenzgel, das lasergestützt abgelesen wird. Zur Auswertung der Basenabfolge kam das Programm CHROMAS (Vers. 1.42; Connor Mc Carthy) zum Einsatz.

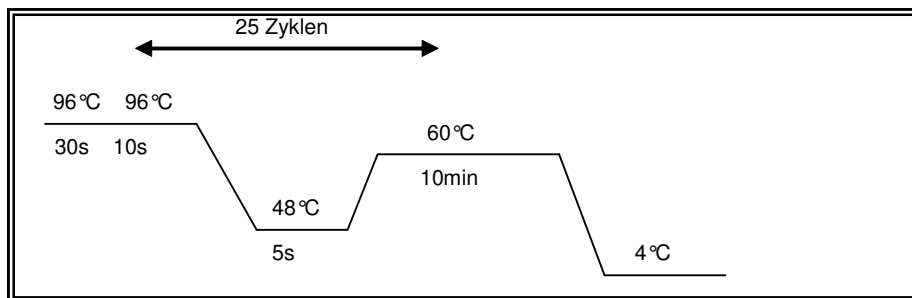


Abb. 3.10 Schematische Darstellung der Sequenzreaktion des *OspA*-Gens

3.9.2 Phylogenetische Analyse

Die Sequenzen der PCR-Produkte wurden mit dem Computerprogramm Clustal W analysiert. Für die Parameter „Gap open penalty“ und „Gap extention penalty“ wurden Werte von 10 bzw. 5 gewählt.

Ähnlichkeitsdiagramme mit vorhandenen Referenzsequenzen wurden mit Hilfe des Programms Phylogenetic Tree erstellt (Page, 1996). Um taxonomische Informationen über die ermittelte Sequenz und Referenzsequenzen aus der NCBI-Datenbank zu erhalten, wurde das Programm BLAST benutzt.

3.10 Statistik

Die Datenerhebung erfolgte durch Eingabe in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corp., Redmont). Die Datenanalyse erfolgte mit dem Statistik Programm SPSS © 11.0 für Windows (SPSS © Inc., Chicago). Hier kamen der t-Test und der Chi-Quadrat-Test zum Einsatz.

Der Chi-Quadrat-Test wird zur Überprüfung von Häufigkeitsverteilungen eingesetzt. Aus zwei Merkmalen (Zecken mit Borrelien und Zecken ohne Borrelien) verschiedener Habitate resultieren Teilgruppen, für die man die beobachteten Häufigkeiten in eine Kreuztabelle einträgt. Dann wird die Häufigkeit bestimmt, die zu erwarten wäre, wenn die beiden Merkmale völlig unabhängig voneinander wären. Dann wird für jedes der vier Felder die Differenz aus beobachteten und erwarteten Häufigkeiten gebildet, quadriert und durch die erwartete Häufigkeit geteilt. Der Chi-Quadrat-Wert wird dann durch die Summe der entsprechenden Werte für alle vier Zellen gebildet. Anhand des Freiheitsgrades kann man den Signifikanzwert p ablesen. Allgemein üblich ist es, einen p-Wert von weniger als 0,05 mit "signifikant" und von

weniger als 0,01 mit "sehr signifikant" zu bezeichnen. In einigen Fällen werden p-Werte von weniger als 0,10 darüber hinaus "grenzwertig signifikant" genannt.

Der t-Test ist eine Entscheidungshilfe dafür, ob ein gefundener Mittelwertsunterschied zufällig ist oder nicht. Zur Durchführung wird der Stichprobenkennwert, die Differenz der Mittelwerte, ermittelt. Eine Nullhypothese nimmt an, dass diese Differenz zufällig ist. Anhand eines berechneten t-Wertes lässt sich prüfen, wie wahrscheinlich die Nullhypothese ist.

Die Untersuchung der Beziehung zwischen mehreren Variablen wird mittels Korrelationkoeffizienten (r) bestimmt. Dieser wird anhand der Wertepaare mittels Berechnung nach Pearson berechnet. Je näher der absolute Wert von r bei 0 ist, umso schwächer ist der lineare Zusammenhang dieser Variablen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung von Thüringer *Borrelia burgdorferi* s. l. -Isolaten

4.1.1 Spezies-Differenzierung und OspA-Subtypisierung

Insgesamt wurden 121 *B. burgdorferi* s. l. Isolate auf ihre Genospezies bzw. OspA-Serotypen hin untersucht. Die Bedingungen der Amplifikation des *OspA*-Gens und die anschließende RFLP für die Kulturen wurden von Michel et al. (2003) übernommen. Bei der PCR zeigten alle Isolate eine Bande mit der Größe von ca. 800bp. Abbildung 4.1 zeigt als Beispiel die Restriktion und die Bestimmung der Genospezies bzw. der OspA-Serotypen von vier Isolaten. Anhand des DNA-Längenstandards kann gut die Größe der Fragmente abgeschätzt und mittels Tabelle 3.6 der OspA-Serotyp bestimmt werden.

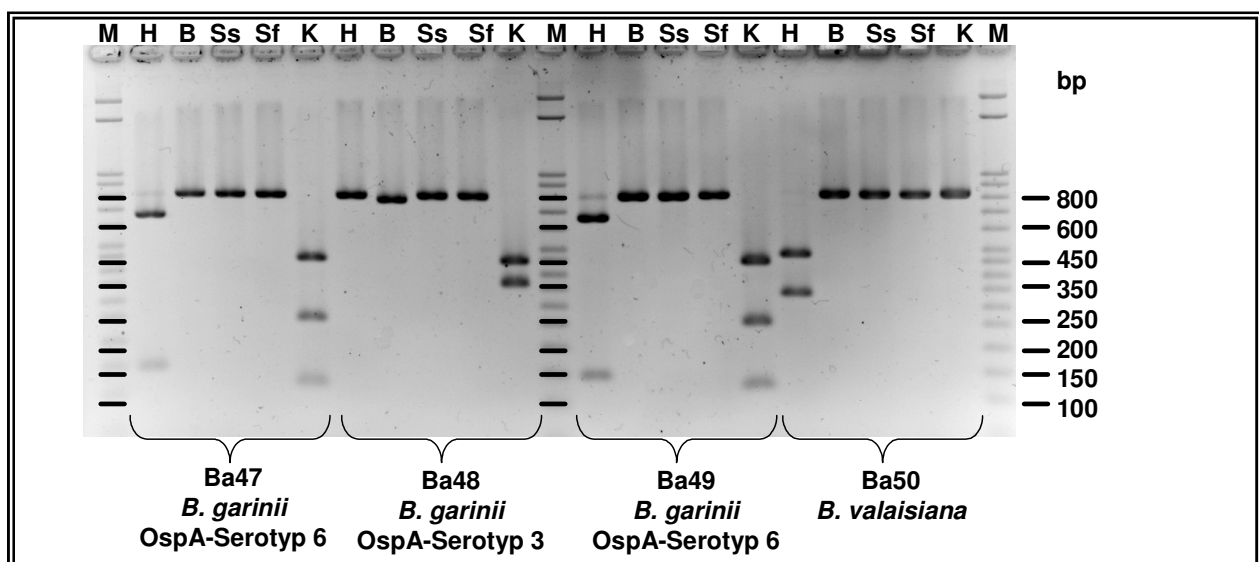


Abb. 4.1 Beispiel der PCR-RFLP des *OspA*-Gens, **M**: DNA-Längenstandard (50bp-Leiter); **H**: Restriktionsenzym HindIII; **B**: Restriktionsenzym BglII; **Ss**: Restriktionsenzym SspI; **Sf**: Restriktionsenzym SfiI; **K**: Restriktionsenzym Kpn2I; **Ba 47-Ba 50**: *B. burgdorferi* Isolate

Für 112 Isolate (92,6%) konnten anhand des Schemas die Genospezies und der OspA-Serotyp bestimmt werden. *B. garinii* war die dominante Genospezies mit einem Anteil von 53,6 % der Kulturen, gefolgt von *B. burgdorferi* sensu stricto (21,5%), *B. valaisiana* (11,6%) und *B. afzelii* (5,0%). Von insgesamt 60 *B. garinii* Isolaten, konnten 45 (75,0%) als Serotyp 6, fünf (8,3%) als Serotyp 3, fünf als Serotyp 5 (8,3%) und sieben als Serotyp 7 (11,7%) identifiziert werden (Abb. 4.2). Mischinfektionen konnten in sechs (5%) der 121 Isolate nachgewiesen werden mit *B. garinii* OspA-Serotyp 5/6 als häufigste Kombination (Abb. 4.2). Vier der doppelt infizierten Isolate stammten von Nymphen und zwei wurden von adulten Tieren gewonnen.

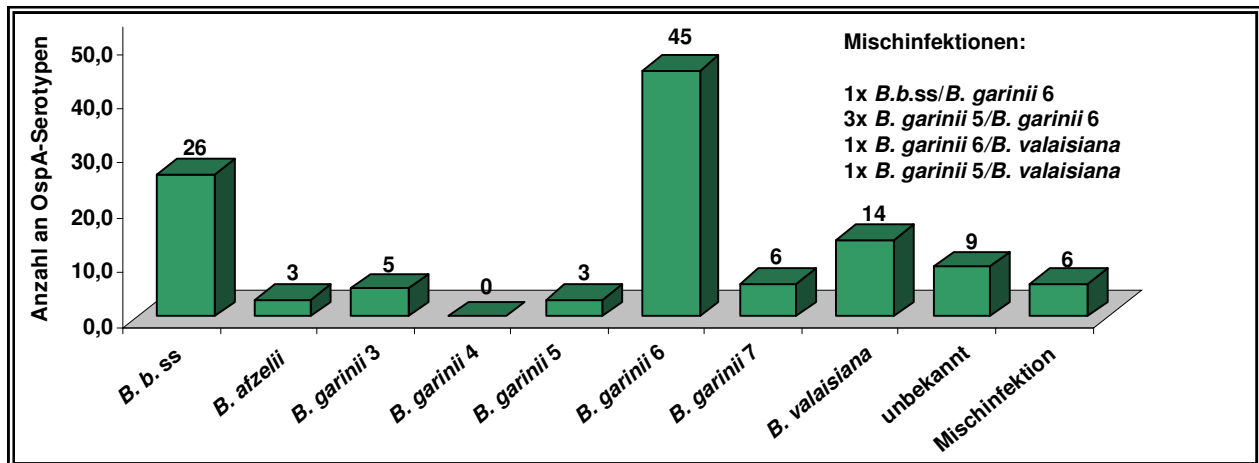


Abb. 4.2 Verteilung der *B. burgdorferi* s. l. Genospezies und OspA-Serotypen in Thüringer Isolat nach PCR-RFLP

Hinsichtlich der Häufigkeit der gefundenen Genospezies zeigte sich die in Abbildung 4.3 gezeigte regionale Verteilung. Der Anteil von *B. afzelii* war mit 2,3%-10% in allen Gebieten niedrig. Etwas höher lag der Anteil von *B. burgdorferi* sensu stricto (6%-13%) und *B. valaisiana* (9,3%-20%), wobei ebenfalls eine geringe lokale Variation gefunden wurde. Als häufigste Genospezies mit einer Prävalenz von 43,3% - 57,4% konnte in allen Gebieten *B. garinii* bestimmt werden. Dabei wurde der Serotyp 3 hauptsächlich in den Isolat aus Bad Berka und Serotyp 7 in denen aus Weimar nachgewiesen. *B. garinii* OspA Serotyp 4 konnte nicht isoliert werden.

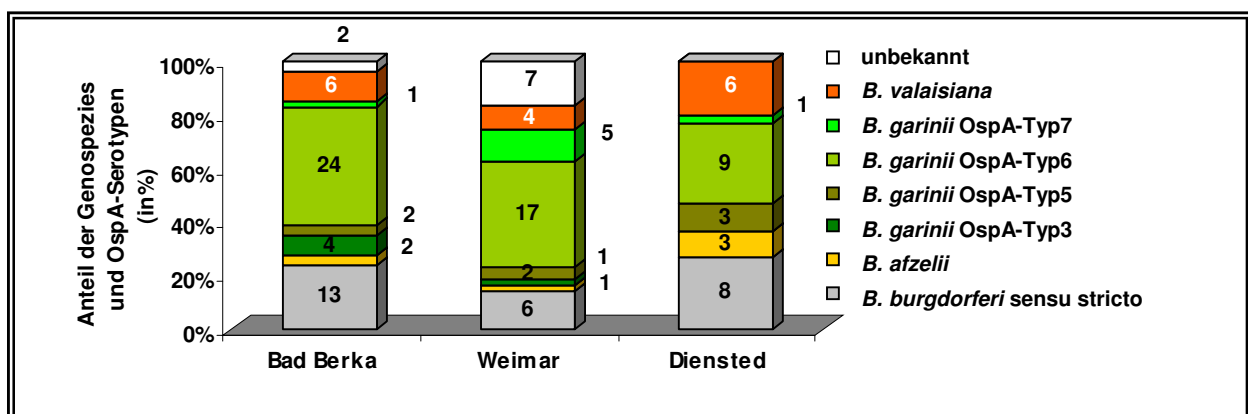


Abb. 4.3 Verteilung der Genospezies und der OspA-Serotypen der Isolate aus Bad Berka, Weimar und Dienstedt. Die Zahlen in den Balken geben die tatsächlichen Isolate an.

Neun der Isolate (7,4%) zeigten ein vom vorhandenen Restriktionsschema abweichendes Restriktionsmuster. Diese stammten überwiegend aus Weimar. Bei diesen Isolat konnten vier verschiedene Restriktionsmuster bestimmt werden (Abb. 4.4). Die Isolate Be9, Be19, Be32, Be40 zeigten Muster a, Isolat Ba52 und Be29 Muster b, Be1 und Be36 zeigte Muster c und Be46 Muster d. Um diese unklaren Restriktionsmuster aufzuklären, wurde das *OspA*-Gen fraglicher Isolate sequenziert (Kap. 3.1.3).

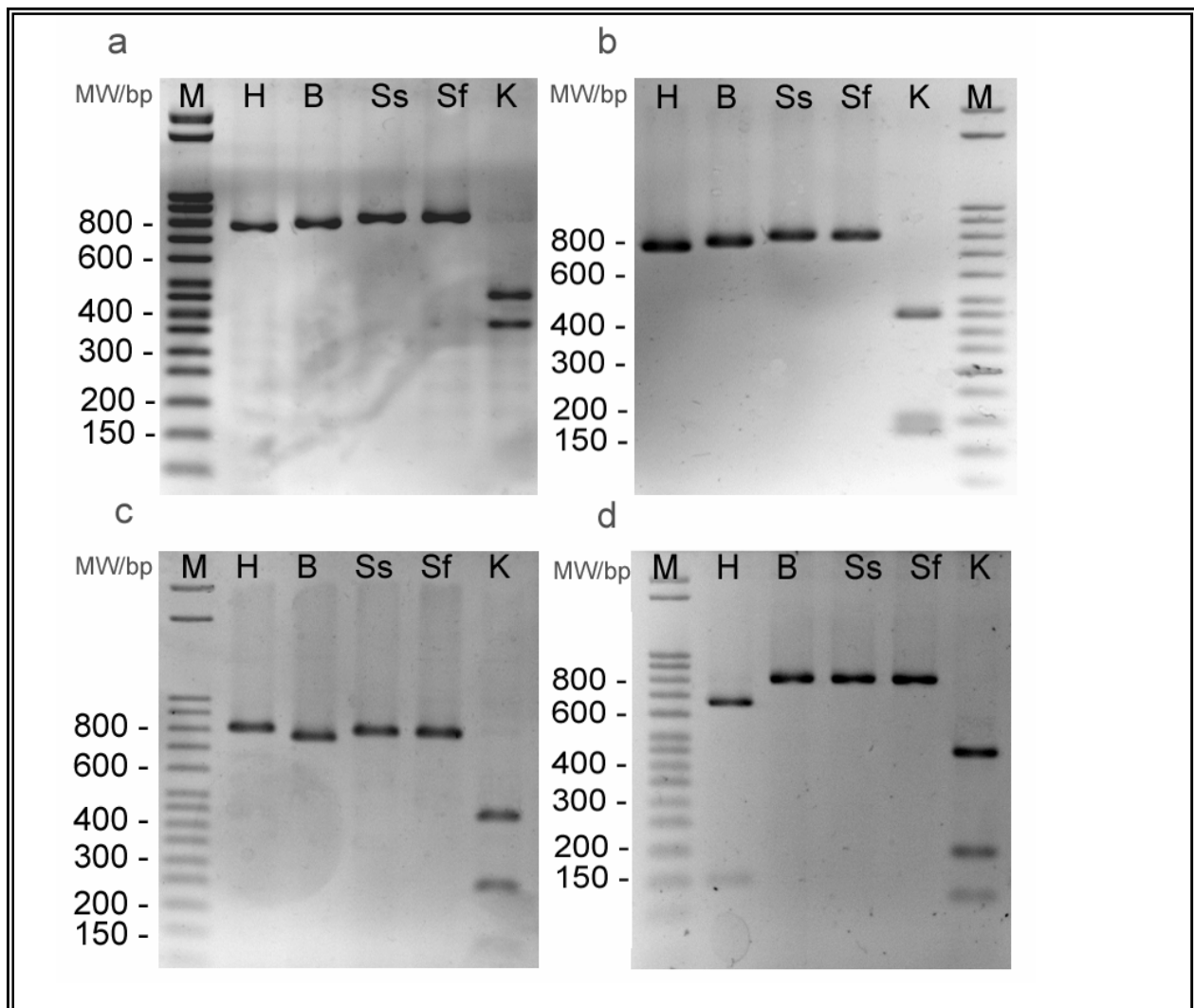


Abb. 4.4 Unbekannte Restriktionsmuster a-d der *B. burgdorferi* s. l. Isolate. **M**: DNA-Längenstandard(50bpLeiter); **H**: Restriktionsenzym HindIII; **B**: Restriktionsenzym BglII; **Ss**: Restriktionsenzym SspI; **Sf**: Restriktionsenzym SfuI; **K**: Restriktionsenzym Kpn2I.

4.1.2 Sequenzanalyse

Es wurden 22 der Kulturen erfolgreich sequenziert. Neben den neun Isolaten, welche das unbekannte Restriktionsmuster zeigten, wurden 11 weitere Isolate aller Genospezies zum phylogenetischen Vergleich untersucht. Die graphische Präsentation der phylogenetischen Analyse ist in der Abbildung 4.5 zu sehen.

Insgesamt konnte eine deutliche Unterteilung der Sequenzen der Thüringer Isolate und der in Tabelle 4.1 dargestellten Vergleichsstämme in die Genospezies festgestellt werden. Als erstes spalten sich *B. valaisiana*, *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. afzelii* ab. Die *B. burgdorferi* sensu stricto Isolate stellten sich als sehr einheitliche Gruppe heraus, wohingegen bei *B. valaisiana* eine Unterscheidung der Thüringer Isolate vom Vergleichsstamm VS116 sichtbar ist.

Bei den *B. garinii* Isolaten in unserem Vergleich war eine deutliche Unterteilung in die einzelnen OspA-Serotypen zu erkennen. Zur ersten sich abspaltenden Gruppe gehören die Isolate BE19,

BE9 und BE4, die das Restriktionsmuster d) zeigten. Sie stehen in enger Korrelation mit dem Vergleichsstamm PKi, der dem OspA Serotyp 8 entspricht. Die restlichen unbekannten Isolate gruppierten sich zu einem Zweig des Baumes zu denen auch *B. garinii* OspA-Serotyp 3 gehört. Innerhalb dieses Zweiges war eine deutliche Unterscheidung der Stämme mit den unterschiedlichen Restriktionsmustern zu erkennen.

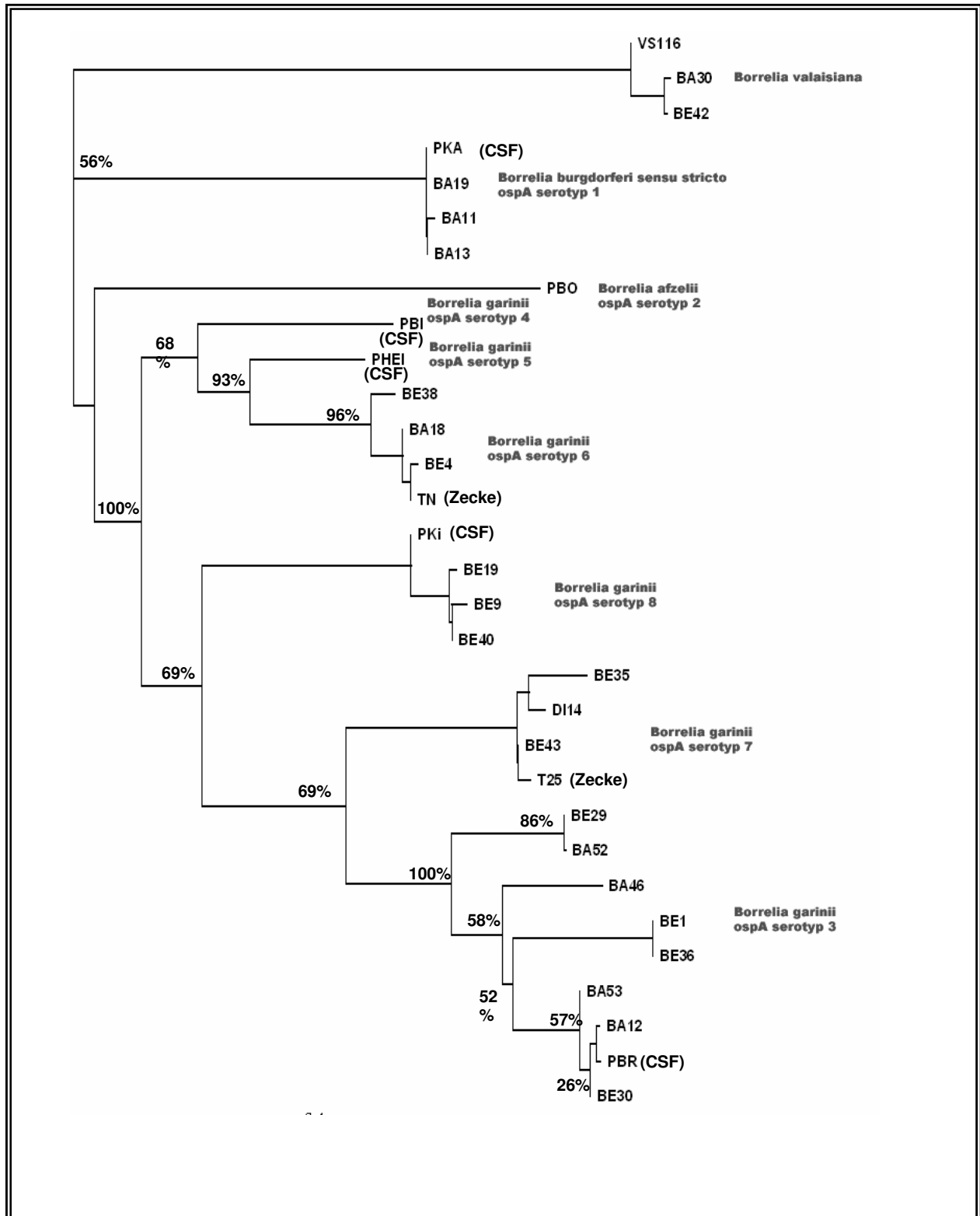


Abb. 4.5 Distanz-Matrix-Dendrogramm des *OspA*-Gens von *B. burgdorferi* s. l.

Es kommt zuerst zur Abspaltung von Be29 und Ba52, welche dem Restriktionsmuster b) entsprechen. Dann folgte Ba 46 mit dem Restriktionsmuster c) und schließlich Be1 Und Be36 mit Restriktionsmuster a). Der letzte Zweig, die Isolate der Serotyp 3 Gruppe zeigten wieder eine enge Korrelation mit den Vergleichsstämmen. Anhand der Sequenzierungen konnten für die unbekannten Restriktionsmuster die in Tabelle 4.1 aufgeführten Fragmentgrößen bestimmt werden. Die Genospezies und OspA-Serotypen der einzelnen Gebiete, bestimmt mittels PCR-RFLP und Sequenzierung, zeigten die in Tabelle 4.2 dargestellte Verteilung.

Tab 4.1 Theoretisch Fragmentgrößen der Restriktion des *OspA*-Gens der Isolate mit unbekanntem Restriktionsmuster (**RM**)

| RM | Hind III | Bgl II | Sspl | Sfu | Kpn 2I | Genospezies (Isolat) |
|----|----------|--------|------|-----|-----------------|--|
| a | 727/74 | 756/45 | 801 | 801 | 429/372 | <i>B. garinii</i> (Ba46) |
| b | 721/74 | 750/45 | 795 | 795 | 429/171/ 195 | <i>B. garinii</i> (Ba52; Be29) |
| c | 798 | 753/45 | 798 | 798 | 429/249/ 120 | <i>B. garinii</i> (Be1; Be36) |
| d | 657/144 | 801 | 801 | 801 | 429/195/ 177 | <i>B. garinii</i> OspA-Serotyp8 (Be9; Be19; Be32; Ba40) |

Tab. 4.2 Verteilung der Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. in den Isolaten aus Bad Berka, Weimar und Dienststedt nach PCR-RFLP und Sequenzierung. Mischinfektionen wurden zur besseren Darstellung getrennt betrachtet. **ss**: sensu stricto; **nb**: nicht bestimmbar

| Genospezies | OspA-Serotyp | Bad Berka | | Weimar | | Dienststedt | |
|--------------------------|--------------|-----------|------|--------|------|-------------|------|
| | | Anzahl | % | Anzahl | % | Anzahl | % |
| <i>B. burgdorferi</i> ss | 1 | 13 | 24,1 | 6 | 14,0 | 8 | 26,7 |
| <i>B. afzelii</i> | 2 | 2 | 3,7 | 1 | 2,3 | 3 | 10 |
| <i>B. garinii</i> | 3-8 | 33 | 61,1 | 32 | 74,4 | 13 | 43,3 |
| OspA-Serotypen | 3 | 4 | 7,4 | 1 | 2,3 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 2 | 3,7 | 2 | 4,7 | 3 | 10 |
| | 6 | 24 | 44,4 | 17 | 39,5 | 9 | 30 |
| | 7 | 1 | 1,9 | 5 | 11,6 | 1 | 3,3 |
| | 8 | 0 | 0 | 4 | 9,3 | 0 | 0 |
| | nb | 2 | 3,7 | 3 | 7 | 0 | 0 |
| <i>B. valaisiana</i> | | 6 | 11,1 | 4 | 9,3 | 6 | 20 |

4.2 Prävalenzuntersuchung und Genotypische Charakterisierung in freilandgefangenen Zecken

4.2.1 Untersuchung der Saisonalität von Prävalenz und Genospezies von *Borrelia burgdorferi* s. l. in Bad Berka 2001 und 2004

Zur Untersuchung der Saisonalität von Prävalenz und Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. wurden in Bad Berka 2001 329 Zecken (180 Adulte und 149 Nymphen) und 2004 478 Zecken (220 Adulte und 258 Nymphen) über das Jahr verteilt gesammelt und mittels PCR-RFLP des *OspA*-Gens typisiert und die Verteilung der Genospezies und der *OspA*-Serotypen bestimmt. Bei Proben die das gemeinsame Restriktionsmuster von *B. valaisiana* Typ2 und *B. spielmanii* zeigten, wurde zur Unterscheidung zusätzlich eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die durchschnittliche Durchseuchungsrate lag 2001 signifikant höher bei 18,4% als 2004 mit 7,1% ($p < 0,001$). Die Infektionsrate 2001/2004 setzte sich zusammen aus 13,5%/3,9% der Nymphen und 22,4%/10,9% bei den Adulten. Innerhalb der Adulten zeigten die Männchen in beiden Jahren mit 18,9%/5,1% eine etwas höhere Durchseuchung als die Nymphen im selben Jahr. Die der Weibchen lag in beiden Fällen signifikant höher bei 25,8%/14,1% (Chi-Quadrat-Test; $p = 0,043$ (2001); $p = 0,02$ (2004)).

Saisonalität der *B. burgdorferi* s. l.-Prävalenz

Im Folgenden wurden die Daten in Bezug auf die Saisonalität der Prävalenzen ausgewertet. Dabei zeigten sich im Jahresverlauf 2001 und 2004 keine signifikanten Unterschiede der Gesamtprävalenz oder der Prävalenzen der einzelnen Entwicklungsstadien (Tab. 4.3; Abb. 4.6). Einzig bei den Männchen 2001 war der Abfall in der Prävalenz vom Frühjahr zum Sommer signifikant (Chi-Quadrat-Test $p = 0,038$).

Tab. 4.3 Saisonale Prävalenzdaten von *B. burgdorferi* s. l. in Bad Berka der Jahre 2001 und 2004

| Stadium | Frühjahr | | Sommer | | Herbst | |
|----------|-----------------|--------------|---------------|-------------|-------------|------------|
| | 2001 (% (n/po)) | 2004 | 2001 | 2004 | 2001 | 2004 |
| Weibchen | 21,4 (28/6) | 15,6 (90/14) | 27,9 (43/12) | 8,1 (37/3) | 30 (20/6) | 20 (15/3) |
| Männchen | 28,6 (28/8) | 4,5 (44/2) | 9,5 (42/4) | 10,5 (19/2) | 26,3 (19/5) | 0 (15/0) |
| Nymphen | 18,5 (54/10) | 5,8 (120/7) | 10,9 (55/6) | 3,1 (96/3) | 10 (40/4) | 0 (42/0) |
| Gesamt | 21,8 (110/24) | 9,1 (254/23) | 15,7 (140/22) | 5,2 (152/8) | 19 (79/15) | 4,2 (72/3) |

n: Gesamtzahl; po: positive Zecken

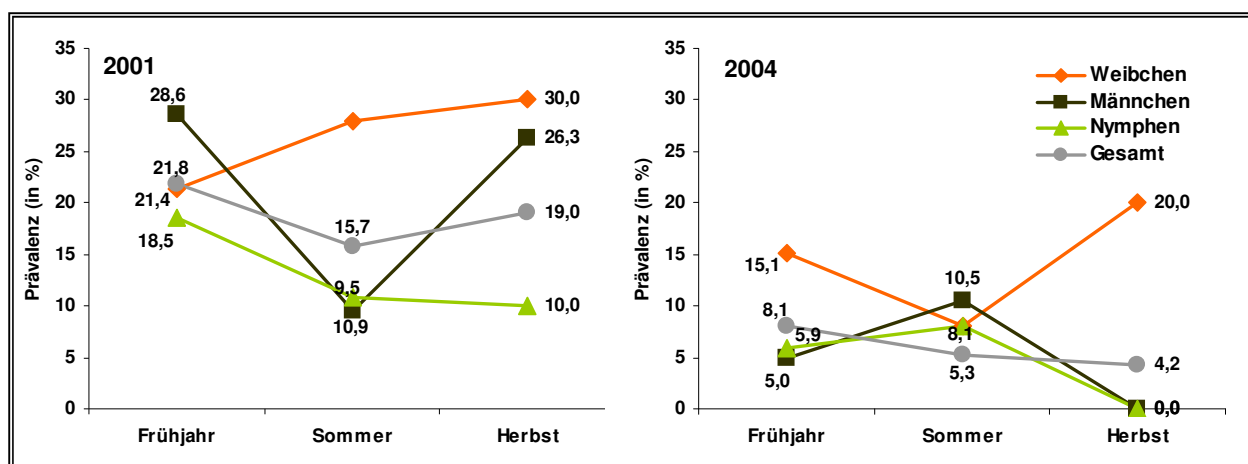


Abb. 4.6 Saisonale Darstellung der Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. der einzelnen Entwicklungsstadien von *I. ricinus*

Saisonalität der Genospezies

Von den insgesamt 61 positiven Proben 2001 ergab sich bei allen ein Restriktionsmuster, nach dem sich anhand Tabelle 3.2 die Genospezies und der OspA-Serotyp bestimmen ließen. Im Jahr 2004 konnten dagegen 4 von 31 wegen einer zu schwachen Bande nicht bestimmt werden. Wie aus Tabelle 4.4 ersichtlich, war *B. burgdorferi* sensu stricto mit 39,4% die am häufigsten gefundenen Genospezies 2001, gefolgt von *B. afzelii* (28,8%) und *B. valaisiana* (18,2%). *B. garinii* war sehr selten mit 4,5%. Für *B. afzelii* und *B. valaisiana* zeigte sich 2004 ein ähnliches Bild. *B. burgdorferi* sensu stricto war mit 20,6% nicht mehr die dominante Genospezies und bei *B. garinii* war ein Anstieg in der Prävalenz zu verzeichnen. Die OspA-Typen 3 und 4 konnten in beiden Jahren nicht gefunden werden.

Tab. 4.4 Verteilung der Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. in Zecken aus Bad Berka. Mischinfektionen wurden zur besseren Darstellung getrennt betrachtet. **ss**: sensu stricto; **nb**: nicht bestimmbar

| Genospezies | OspA-Serotyp | 2001 | | 2004 | |
|----------------------------|--------------|--------|------|--------|------|
| | | Anzahl | % | Anzahl | % |
| <i>B. burgdorferi</i> ss | 1 | 26 | 39,4 | 7 | 20,6 |
| <i>B. afzelii</i> | 2 | 19 | 28,8 | 7 | 20,6 |
| <i>B. garinii</i> | 3-8 | 3 | 4,5 | 7 | 20,6 |
| OspA-Serotypen | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 1 | 3,0 | 2 | 5,9 |
| | 6 | 2 | 1,5 | 4 | 11,8 |
| | 7 | 0 | 0 | 1 | 2,9 |
| <i>B. valaisiana</i> | | 12 | 18,2 | 6 | 17,6 |
| <i>B. valaisiana</i> Typ 2 | | 6 | 9,1 | 3 | 8,8 |
| nb | | 0 | 0 | 4 | 11,8 |

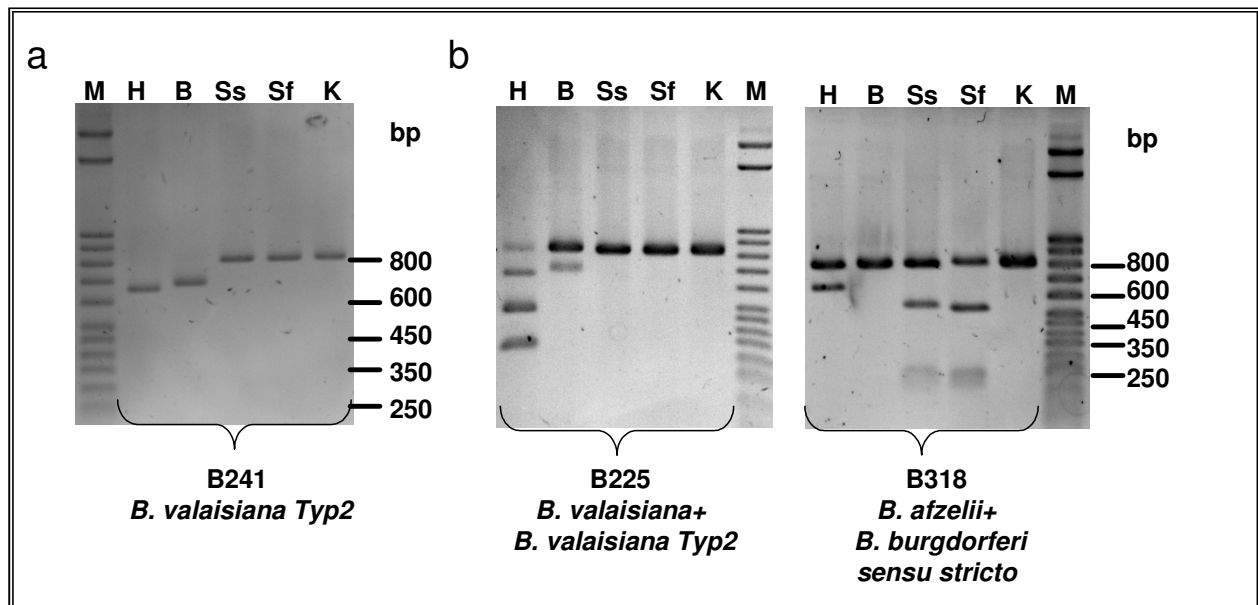


Abb. 4.7 a) Restriktionsmuster der Zecke B241 b) Restriktionsmuster der Mischinfektionen der Zecken B225 und B318. **M**: DNA-Längenstandard (50bp-Leiter); **H**: Restriktionsenzym HindIII; **B**: Restriktionsenzym BglII; **Ss**: Restriktionsenzym SspI; **Sf**: Restriktionsenzym SfuI; **K**: Restriktionsenzym Kpn2I.

Acht Stränge zeigten das RFLP-Muster in Abbildung 4.7a. Laut DNA-Sequenzalignment und dem daraus resultierenden RFLP-Muster stimmt es sowohl mit dem Stamm *B. spielmanii* und einem zweiten *B. valaisiana* Typ (Typ M53) überein. Zur Absicherung der Typisierung wurden diese Stämme sequenziert. Bei allen konnte die größte Übereinstimmung mit dem Vergleichsstamm M53, welcher dem *B. valaisiana* Typ2 entspricht, festgestellt werden.

Mischinfektion zeigten fünf der untersuchten Zecken 2001 und drei in 2004. In Abbildung 4.7b sind zwei RFLP-Muster dieser Mischinfektionen dargestellt. Diese beiden Kombinationen sind auch die einzigen, die in Zecken aus Bad Berka nachgewiesen werden konnten.

Für die Genospezies *B. valaisiana* und *B. burgdorferi sensu stricto* ergaben sich vom Frühjahr zum Sommer 2001 und zum Herbst signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten. Betrachtet man die positiven Proben fiel die Prävalenz von *B. burgdorferi sensu stricto* von 70,8% auf 28,0% (Chi-Quadrat-Test, $p=0,003$). Ein signifikanter Anstieg von 0% auf 48,0% zeigte sich bei *B. valaisiana* (Chi-Quadrat-Test, $p=0,002$). Im Jahr 2004 konnte dieser Trend ebenfalls beobachtet werden, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant. Bezüglich des Entwicklungszustandes mit *B. burgdorferi sensu stricto* infizierter Zecken konnte kein Unterschied festgestellt werden. Mit *B. valaisiana* waren hauptsächlich adulte Zecken infiziert (Abb. 4.8).

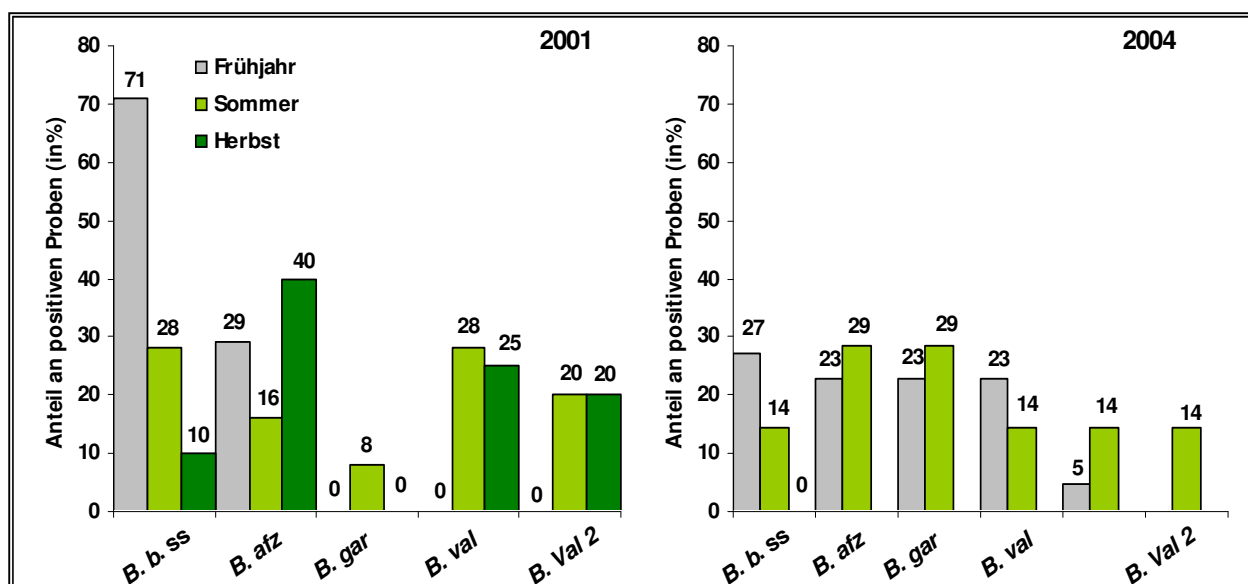


Abb. 4.8 Saisonale Verteilung der Genospezies und vorkommenden OspA-Serotypen in Bad Berka. 2001 und 2004 **B. b. ss**: *B. burgdorferi* sensu stricto; **B. afz**: *B. afzelii*; **B. gar5**: *B. garinii* OspA-Serotyp 5; **B. gar6**: *B. garinii* OspA-Serotyp 6; **B. val**: *B. valaisiana*; **B. val2**: *B. valaisiana* Typ II; **nb**: nicht bestimmbar

4.2.2 Untersuchung an freilandgefangenen Zecken in Thüringen (Prävalenzstudie für das Thüringer Ministerium für Familie, Soziales und Gesundheit)

4.2.2.1 Dichte von *Ixodes ricinus* und Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* s. l.

Es konnten mit Ausnahme von Katzhütte auf allen Flächen Zecken nachgewiesen werden. Bei den gefundenen Zecken handelt es sich ausschließlich um die Art *I. ricinus*. In Abbildung 4.9 wird die Zeckendichte der Fanggebiete dargestellt.

Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die Mehrheit von Fangflächen eine geringe Zeckendichte aufweist. Diese liegen größtenteils im Thüringer Wald, Thüringer Schiefergebirge und der Rhön. Eine weitere Häufung von Gebieten mit geringerer Zeckendichte findet sich im Thüringer Becken. Hohe Zeckendichten dagegen fanden sich in den Flusstälern von Ilm und Saale.

Von uns wurden im Jahr 2002 insgesamt 3103 Zecken untersucht. 1487 Zecken kamen im Immunofluoreszenztest zum Einsatz und 1616 wurden mittels PCR des *OspA* Gens und der 5S-23S rRNA intergenic spacer Region untersucht. Allerdings geben die Anteile der einzelnen Entwicklungsstadien der untersuchten Zecken nicht die Verhältnisse auf den Fangflächen wieder, z. B. Männchen wurden nicht so häufig untersucht, da sie aufgrund ihres Entwicklungszyklus (fehlende dritte Blutmahlzeit) im Vergleich zu den weiblichen Tieren keine Rolle bei der Übertragung des Borrelioseerregers spielen.

Beim Vergleich beider PCR Methoden zeigte sich eine Übereinstimmung der positiven Ergebnisse. Allerdings war bei den Restriktionsergebnissen der 5S-23S rRNA Region eine

Beurteilung von Mischinfektionen schwierig. Im Folgenden sind nur die Ergebnisse der OspA-PCR dargestellt.



Abb. 4.9 Dichte von *I. ricinus* in Thüringen

Für ganz Thüringen ergibt sich bei der Untersuchung in der PCR eine mit 13,9% nur gering erhöhte Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. gegenüber dem IFT mit 12,9%. Die Werte der einzelnen Entwicklungsstadien sind in Tabelle 4.5 dargestellt. Die durchschnittliche Infektionsrate der Adulten liegt bei beiden Methoden signifikant höher als bei den Nymphen (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,001$). Es gab auch erhebliche regionale Unterschiede in der Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l., auf die im Kapitel 4.2.2.4 näher eingegangen wird.

Tab. 4.5 Ergebnisse der Prävalenzuntersuchung mittels PCR und IFT

| Stadium | PCR | | | IFT | | |
|----------|--------|---------|-------------|--------|---------|-------------|
| | Anzahl | positiv | % | Anzahl | positiv | % |
| Weibchen | 419 | 94 | 22,4 | 201 | 46 | 22,9 |
| Männchen | 225 | 31 | 13,7 | 252 | 55 | 21,8 |
| Nymphen | 972 | 100 | 10,3 | 1034 | 79 | 7,6 |
| Gesamt | 1616 | 225 | 13,9 | 1487 | 180 | 12,9 |

4.2.2.2 Spezies-Differenzierung und OspA-Subtypisierung

Alle Amplifikate der *OspA*-PCR wurden mittels RFLP weiter analysiert. Die Zuordnung der Schnittmuster erlaubte bei allen 225 Proben die Bestimmung der Genospezies und der *OspA*-Serotypen. Mit 31,4% war *B. afzelii* die häufigsten Genospezies, dicht gefolgt von *B. garinii* mit 30,2% und *B. valaisiana* mit 29,4%. *B. burgdorferi* sensu stricto war mit 9,0% weniger vertreten (Abb. 4.10). *B. lusitaniae*, *B. bisettii* und die neue Genospezies A14S konnten nicht gefunden werden. Unter den mit *B. garinii* infizierten Zecken konnte hauptsächlich *OspA*-Typ 6 mit 87,8% nachgewiesen werden. *B. garinii* *OspA* Typ 5 war weniger häufig mit 10,8%. *OspA*-Typ 4 konnte in nur einer adulten Zecke aus Rudolstadt nachgewiesen werden. Unterschiede zeigten sich in der Verteilung der Genospezies in den unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *I. ricinus*. *B. burgdorferi* sensu stricto konnte in Adulten mit 12,3% häufiger als in Nymphen (4,7%) gefunden werden. Umgekehrt war *B. afzelii* mit 37,4% häufiger in Nymphen als in Adulten (26,8%). *B. garinii* und *B. valaisiana* zeigten keine Unterschiede. Wie bei der Prävalenz existierten starke regionale Schwankungen in der Verteilung der Genospezies und der *OspA*-Serotypen (Kap. 4.3.3).

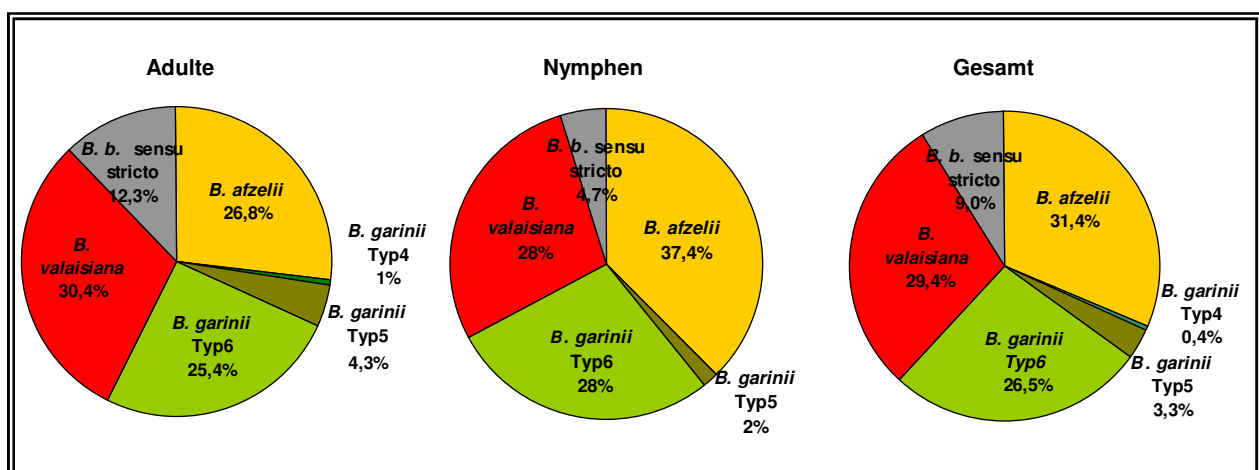


Abb. 4.10 Verteilung der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. und *OspA*-Serotypen von *B. garinii* in allen Gebieten in Thüringen

4.2.2.3 Mischinfektionen

Das Schnittmuster von 20 Zecken zeigte eine Mischinfektion von zwei verschiedenen Genospezies oder *OspA*-Serotypen (Abb. 4.11a). Mit 11,3% der gesamten positiven Adulten liegt der Anteil der Mischinfektionen fast doppelt so hoch wie der Anteil bei den positiven Nymphen, der bei 6,0% lag. Die häufigste Kombination war *B. burgdorferi* sensu stricto mit *B. afzelii* gefolgt von *B. garinii* *OspA* Serotyp 6 mit *B. valaisiana*. Fast ebenso häufig ist eine Coinfektion von *B. valaisiana* mit *B. valaisiana* Typ2. Drei Zecken zeigten eine Mischung zweier

B. garinii Subtypen (OspA-Serotypen 5 und 6). Mit nur einem Fall ist die Kombination von *B. garinii* mit *B. afzelii* sehr selten (Abb. 4.11b).

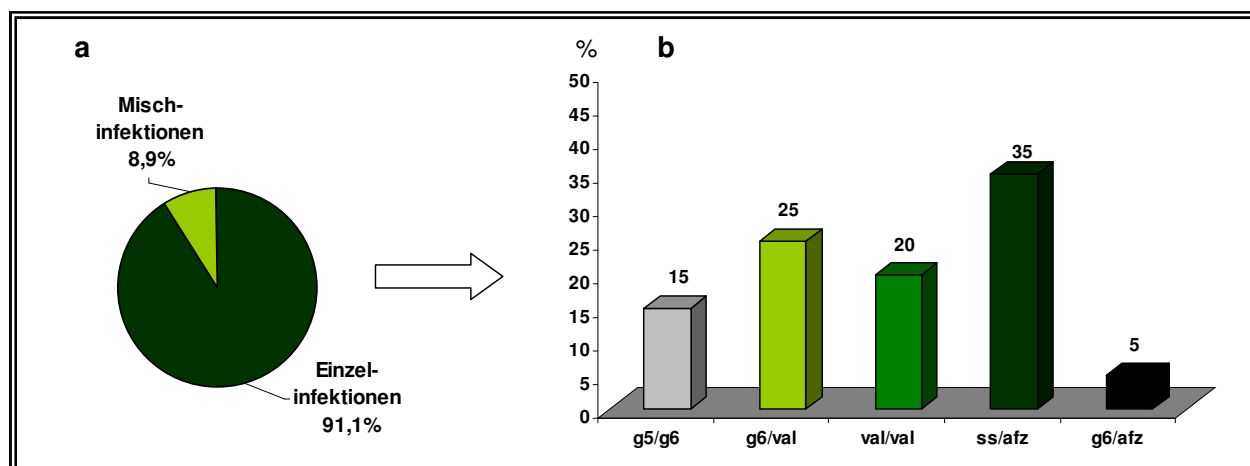


Abb. 4.11 Mischinfektionen in *B. burgdorferi* s. l. positiven Zecken. **a)** Anteil der Mischinfektionen **b)** Anteil der Kombinationen an den Mischinfektionen

4.2.2.4 Borrelien-Infektion in Abhängigkeit von der geographischen Lage

Prävalenz

Zur besseren Veranschaulichung der Datenlage wurde Thüringen in Pools eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte nach dem Prinzip weitgehend gleicher geografischer Bedingungen. Für diese einzelnen Pools, in Abbildung 4.13 dargestellt, wurden die Prävalenzen ermittelt (Abb. 4.12). Die Prävalenzdaten der Nymphen und Adulten zeigten eine große Bandbreite in den unterschiedlichen Pools. Die Werte variierten von 3,9% -13,3% bei den Nymphen und von 10,0%-28,5% bei den Weibchen. In allen Pools konnten die höchsten Durchseuchungsraten bei den Weibchen gefunden werden. Signifikant waren die Unterschiede allerdings nur im Pool Thüringer Becken (Chi-Quadrat-Test, $p=0,007$), Saale-/Ilmtal (Chi-Quadrat-Test, $p<0,001$) und Thüringer Wald (Chi-Quadrat-Test, $p=0,003$). Eine Betrachtung der Männchen erfolgte hier nicht, da sie nur in geringen Mengen untersucht wurden, da sie bei der Übertragung des Erregers keine Rolle spielen. Die Pools mit der geringsten Durchseuchungsrate sind die Rhön (5,6%), das Thüringer Becken (9,3%) und der Thüringer Wald (10,1%). In diesen Gebieten war auch die durchschnittlich geringste Zeckendichte nachzuweisen. Hohe Infektionsraten findet man in den Regionen Altenburger Land (17,5%), Saale/ Ilmtal (17,1%) und im Eichsfeld (15,2%). Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen:

- Altenburger Land vs. Thüringer Becken ($p=0,038$; Chi-Quadrat-Test)
- Altenburger Land vs. Thüringer Wald ($p=0,025$; Chi-Quadrat-Test)
- Saale-/Ilmtal vs. Thüringer Becken ($p=0,012$; Chi-Quadrat-Test)
- Saale-/Ilmtal vs. Thüringer Wald ($p=0,004$; Chi-Quadrat-Test)

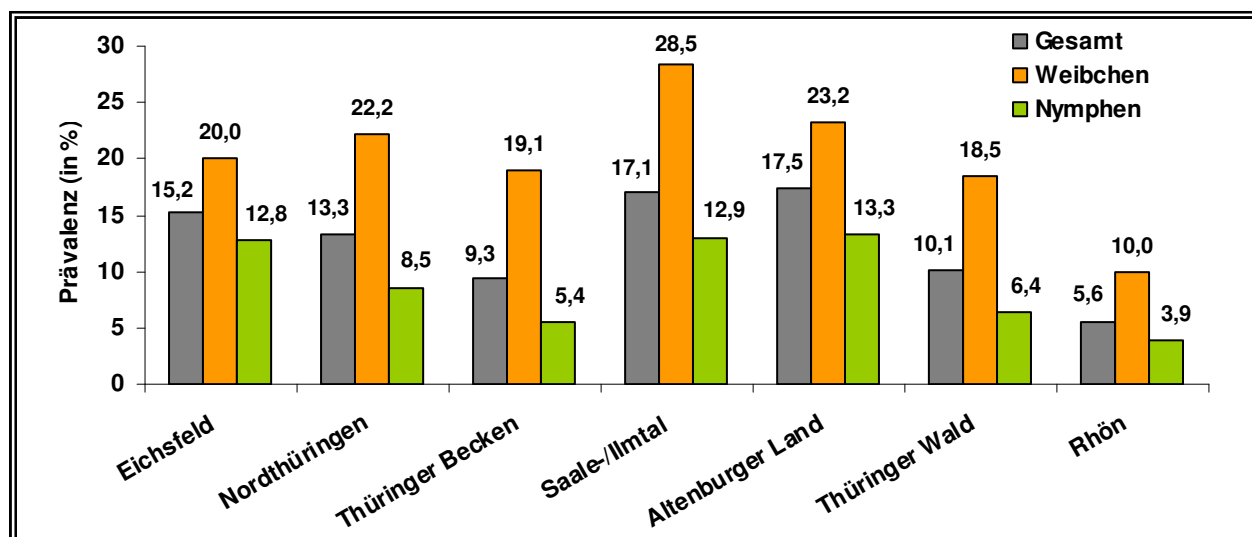


Abb. 4.12 Verteilung der Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. der einzelnen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* in den Pools in Thüringen

Genospezies und OspA-Serotypen

In Bezug auf die Verteilung der Genospezies (Abb. 4.13) und OspA-Serotypen (Tab. 4.6) können starke regionale Unterschiede festgestellt werden. So war im Eichsfeld und Nordthüringen *B. valaisiana* die dominante Genospezies, gefolgt von *B. garinii*. *B. afzelii* und *B. burgdorferi* sensu stricto waren nur in geringen Mengen nachweisbar. Im Thüringer Wald, Altenburger Land und Saale/Ilm-Tal wurde *B. afzelii* am häufigsten bestimmt. Auch hier war *B. garinii* die zweithäufigste Genospezies. Im Thüringer Wald konnte mit 16,1% und im Saale-Ilmtal mit 12,4% ein, im Vergleich zu den anderen Gebieten (2,2%-8,1%), relativ hoher Anteil an *B. burgdorferi* sensu stricto gefunden werden (Abb. 4.13).

Tab. 4.6 Verteilung der Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. in den Pools in Thüringen. Mischinfektionen wurden jeweils getrennt zugeordnet.

| Genospezies | OspA-Serotyp | Pools (Anzahl gefundener Genospezies) | | | | | | |
|--------------------------|--------------|---------------------------------------|----------------|------------------|---------------|------------------|----------------|------|
| | | Eichsfeld | Nord-Thüringen | Thüringer Becken | Saale/Ilm-Tal | Altenburger Land | Thüringer Wald | Rhön |
| <i>B. burgdorferi</i> ss | 1 | 1 | 1 | 0 | 3 | 12 | 5 | 0 |
| <i>B. afzelii</i> | 2 | 10 | 1 | 3 | 34 | 15 | 13 | 1 |
| <i>B. garinii</i> | 3-8 | 13 | 5 | 7 | 29 | 12 | 7 | 1 |
| OspA-Serotypen | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 1 | 0 | 2 | 4 | 0 | 1 | 0 |
| | 6 | 12 | 5 | 5 | 24 | 12 | 6 | 1 |
| | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>B. valaisiana</i> | | 21 | 8 | 8 | 23 | 7 | 6 | 0 |

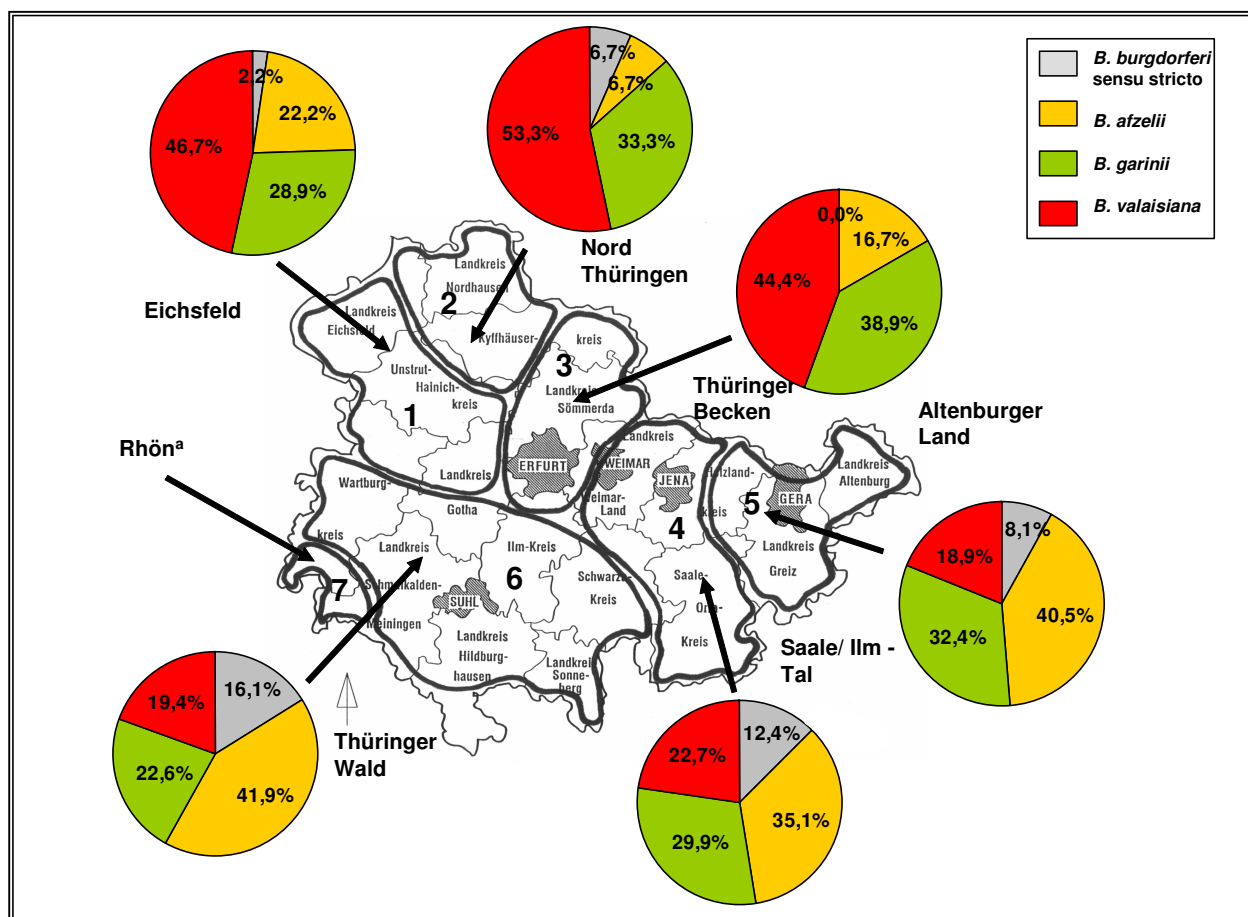


Abb. 4.13 Verteilung der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. in den Pools in Thüringen

Für die untersuchten Gebiete ergaben sich die in Tabelle 4.7 dargestellten signifikanten Unterschiede bezüglich der Anteile der verschiedenen Genospezies. Alle anderen Werte lagen deutlich über dem Signifikanzniveau von 0,05.

Tab. 4.7 Signifikanzergebnisse für die Unterschiede in den Anteilen der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. der unterschiedlichen Gebiete **g. s.:** grenzwertig signifikant

| Gebiet | Altenburger Land | Saale-/Ilmtal | Thüringer Wald |
|---------------|--------------------|--------------------|----------------|
| Eichsfeld | val: p=0,01 | val: p=0,01 | val: p=0,02 |
| | afz: p=0,08 (g.s.) | afz: p=0,06 (g.s.) | afz: p=0,05 |
| Nordthüringen | val: p=0,02 | val: p=0,01 | val: p=0,01 |
| | afz: p=0,02 | afz: p=0,02 | afz: p=0,02 |

In Abbildung 4.14 ist die Verteilung der OspA-Serotypen von *B. garinii* in den einzelnen Pools dargestellt. Unter den gefundenen *B. garinii* OspA-Serotypen war *B. garinii* Serotyp 6 mit 87,7% der häufigste Serotyp. Serotyp 5 war mit 11,0% selten. Der größte Anteil von Zecken mit Serotyp 5 (28,6%) wurde im Thüringer Becken bestimmt. Serotyp 4 konnte nur in einer Zecke (1,3%) aus Rudolstadt gefunden werden. Die *B. garinii* OspA-Serotypen 3, 7 und 8, die in

Kulturen aus Thüringer Zecken nachgewiesen wurden, konnten bei der direkten Bestimmung aus den Zecken nicht detektiert werden.

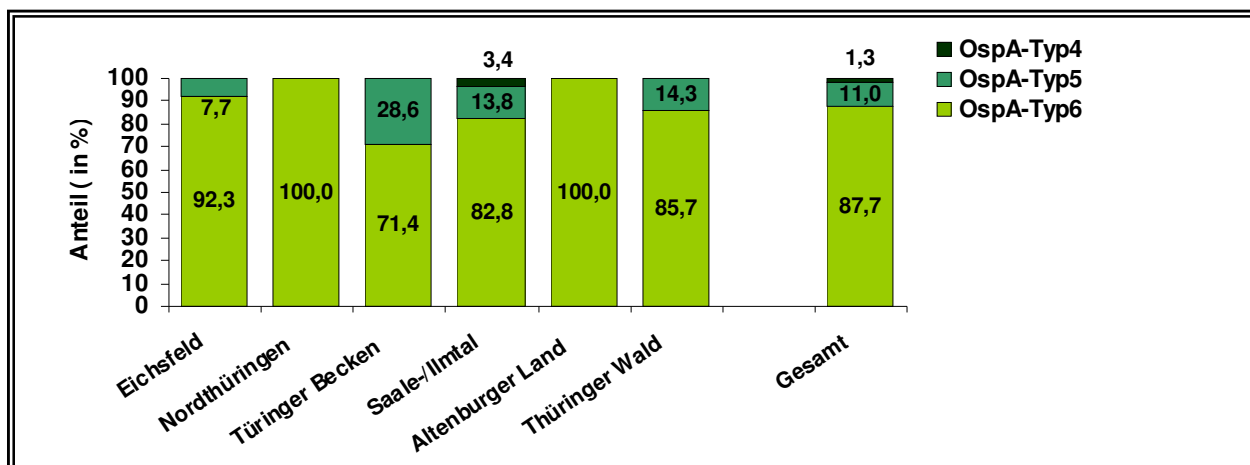


Abb. 4.14 Verteilung der OspA-Serotypen von *B. garinii* in den Pools in Thüringen

Vergleicht man die Genospezies der einzelnen Zeckenstadien in den Pools, sind ebenfalls Unterschiede zu erkennen (Abb.4.15).

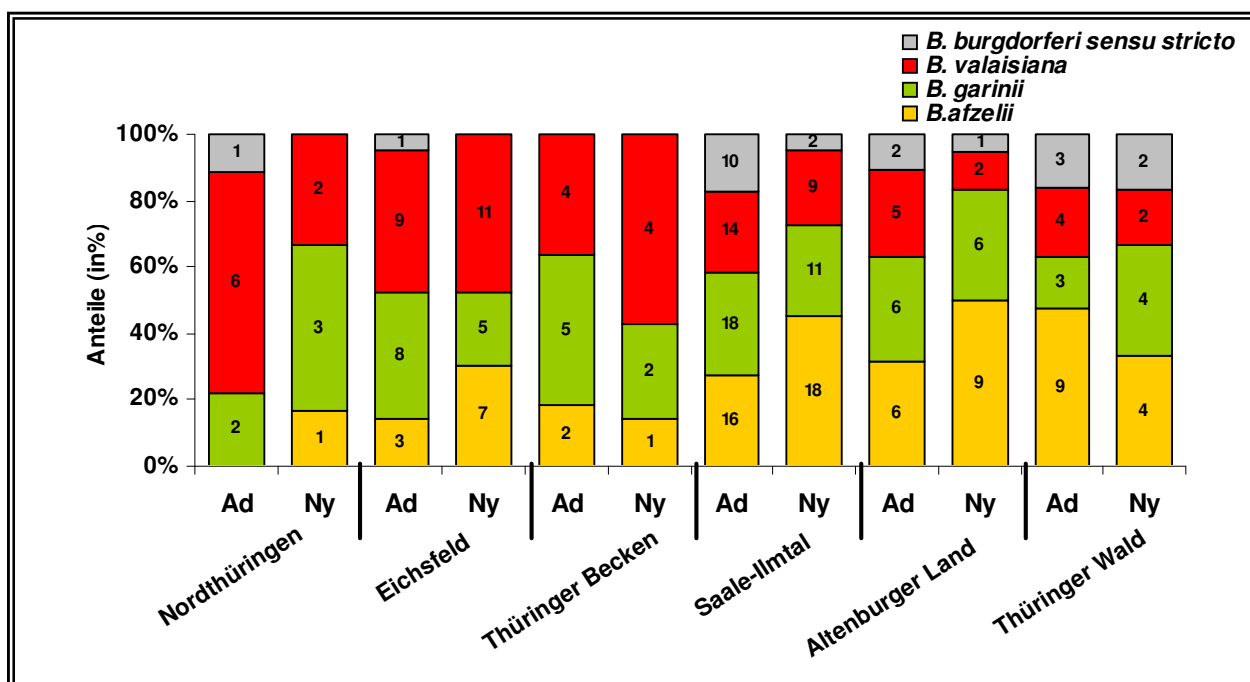


Abb. 4.15 Verteilung der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. in den Pools, unterteilt nach dem Entwicklungsstadium von *I. ricinus*. Die Zahlen in den Balken geben die tatsächlichen Zeckenzahlen an.

Im Eichsfeld, Saale-Ilmtal und Altenburger Land konnte *B. afzelii* deutlich häufiger in Nymphen gefunden werden. Im Thüringer Wald war diese Genospezies deutlich häufiger in adulten Zecken nachzuweisen. *B. garinii* war im Eichsfeld, Thüringer Becken und Altenburger Land in Adulten dominant. In Nordthüringen und im Thüringer Wald war der Anteil in den Nymphen höher. In Nordthüringen, Altenburger Land und Thüringer Wald war *B. valaisiana* häufiger in

Adulten, während diese Genospezies im Thüringer Becken häufiger in Nymphen zu finden war. In Gebieten, wo *B. burgdorferi* sensu stricto vorkam, war diese Genospezies in adulten Zecken dominant. Ausnahme war der Thüringer Wald. Hier war die Prävalenz von *B. burgdorferi* sensu stricto in beiden Stadien gleich.

4.3 Untersuchung der Kleinsäuger

4.3.1 Fangdaten und Infestation mit *Ixodes ricinus*

In den Jahren 2001, 2002 und 2004 wurden insgesamt 425 Kleinsäuger untersucht. Diese setzten sich zusammen aus 250 *A. flavicollis* (Gelbhalsmaus) und 175 *M. glareolus* (Rötelmaus).

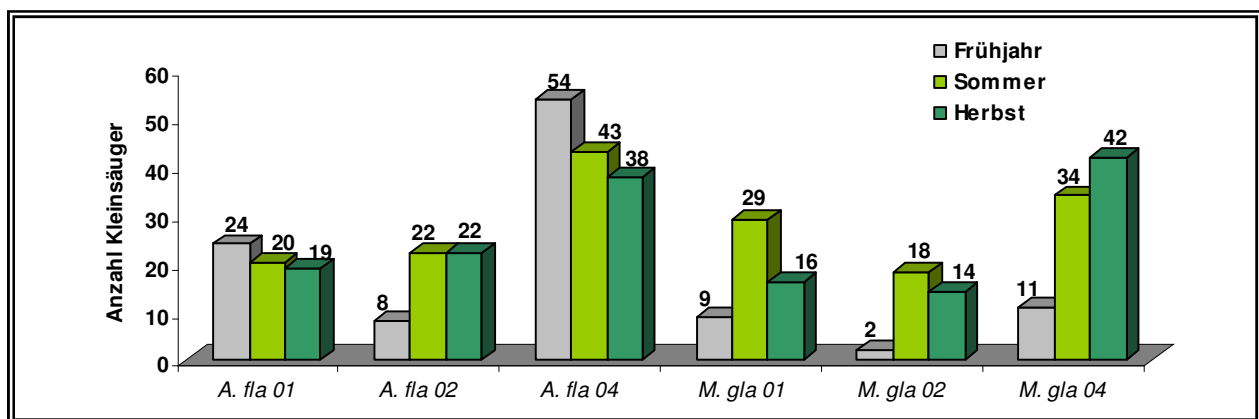


Abb. 4.16 Saisonale Fangdaten der Kleinsäuger in den Jahren 2001, 2002 und 2004.

Die Untersuchung der Kleinsäuger im Jahr 2004 wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von J. Franke durchgeführt (Franke, 2005). Bei der saisonalen Betrachtung der Individuenzahlen ergab sich das in Abbildung 4.16 dargestellte Bild. Deutlich war das geringe Vorkommen von *M. glareolus* im Frühjahr, das sich in allen drei Jahren wiederholte. *A. flavicollis* zeigte 2001 und 2004 einen stetigen Abfall der Fangzahlen zum Herbst hin.

Der Befall der Kleinsäuger mit Larven insgesamt ist mit einem Wert von 7,06 Larven/Tier signifikant höher als der Befall mit Nymphen mit einem Wert von 0,07/ Tier (t-Test; $p < 0,001$). Beim Vergleich der einzelnen Jahre konnte von 2001 zu 2002 ein signifikanter Anstieg der Infestationsrate von 5,2 auf 12,1 Larven/Tier festgestellt werden. Im Frühjahr und Sommer 2002 waren Tiere mit über 30 Larven keine Seltenheit. 2004 sank die Infestationsrate wieder signifikant ab auf 6,23 Larven/Tier (t-Test; $p < 0,001$). In den Jahren 2001 und 2002 konnten bei *A. flavicollis* signifikant höhere Befallsraten gefunden werden als bei *M. glareolus* (t-Test; $p_{2001} = 0,012$; $p_{2002} < 0,001$). Im Jahr 2004 gibt es keine signifikanten Unterschiede der beiden Arten.

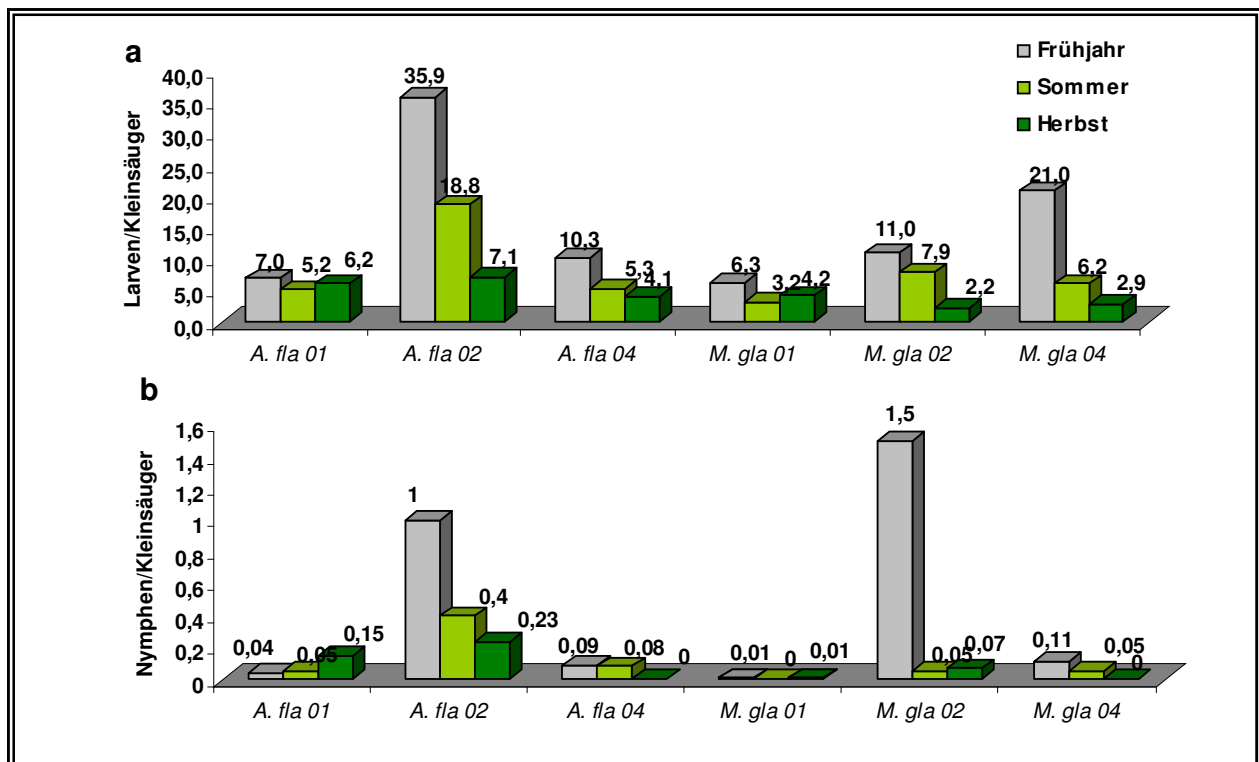


Abb. 4.17 Infestationsraten der Kleinsäuger mit **a)** Larven und **b)** Nymphen in den Jahren 2001, 2002 und 2004; **A. fla:** *A. flavicollis*; **M. gla:** *M. glareolus*.

Die saisonale Darstellung der Infestation mit Larven erfolgt in Abbildung 4.17a. Deutlich zu sehen ist die Abnahme vom Frühjahr zum Herbst, die für beide Kleinsäugerarten zutrifft und statistisch signifikant ist. Eine Ausnahme bildet hier das Jahr 2001, wo vom Sommer zum Herbst wieder ein Anstieg verzeichnet werden konnte, der allerdings nicht den Frühjahrswert erreichte. Der Abfall der Befallsraten vom Frühjahr zum Sommer ist signifikant (t-Test; $p < 0,001$). Abbildung 4.17b zeigt den sehr geringen Befall mit Nymphen in allen drei Jahren. Nur im Frühjahr 2002 konnten Werte von mehr als einer Nymphe/Tier festgestellt werden.

4.3.2 Etablierung und Optimierung der DNA-Extraktion

Beim Einsatz der verschiedenen Extraktionsmethoden für die mit zermörsertem negativen *I. ricinus* Nymphen, negativem Mäuseblut und verschiedenen *B. burgdorferi* s. l. Verdünnungsstufen versetzten Proben und anschließender PCR nach Michel et al. (2004), zeigte der SIGMA GenElute™ Bacetrial Genomic DNA Kit die besten Ergebnisse. Eluiert wurde die DNA mit 60µl Elutionspuffer nach einer Inkubation bei Raumtemperatur. Die Amplifikation der Proben mit Zecke ergab bei einer von zwei Proben eine Nachweisgrenze von 10 Borrelien pro 10µl (ein PCR-Ansatz). Die mit Kleinsäugerblut versetzten Proben zeigten eine Nachweisgrenze von 100 Borrelien pro 10µl. Abbildung 4.18 zeigt das Gel der einzelnen Extraktionsversuche mit anschließender PCR des *OspA*-Gens.

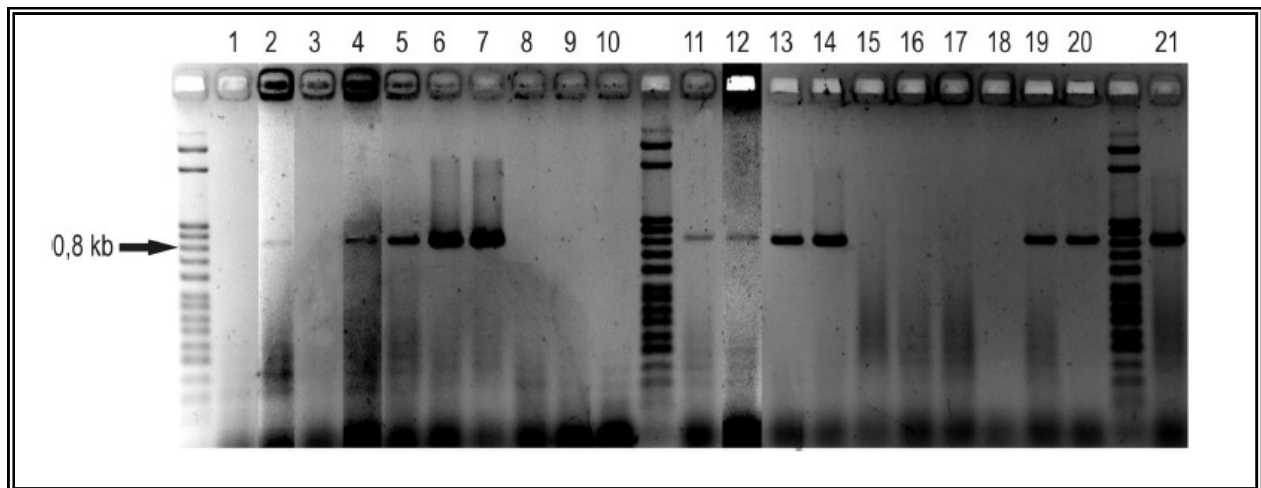


Abb. 4.18 Validierung des SIGMA GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kits. Schwach sichtbare Banden wurden kontrastverstärkt.
Aufgetragenen Proben: 1-KN0; 2/3-KN10; 4/5-KN100; 6/7-KN1000; 8-K0; 9/10-K10; 11/12-K100; 13/14-K1000; 15-KB0; 16/17-KB10; 18/19-KB100; 20/21-KB1000. **K**: *B. burgdorferi* Kultur in der Verdünnungsstufe 0, 10, 100 und 1000 Spirochäten/10µl. **KN**: Kultur + zermörserte negative *I. ricinus* Nymphe. **KB**: Kultur+ 2µl Blut eines negativen Kleinsäugers

4.3.3 PCR-RFLP der Mäuseproben und gesogenen Zecken

Aus dem Jahr 2004 konnten 337 Larven und 7 Nymphen von 117 Kleinsäugern und Biopsieproben von 113 Kleinsäugern in die Untersuchung einbezogen werden. Die Untersuchung der Proben aus dem Jahr 2001 und 2002 wurde eingestellt, da nach einem Ausfall des Kühlschranks die Unversehrtheit der Proben nicht sichergestellt werden konnte.

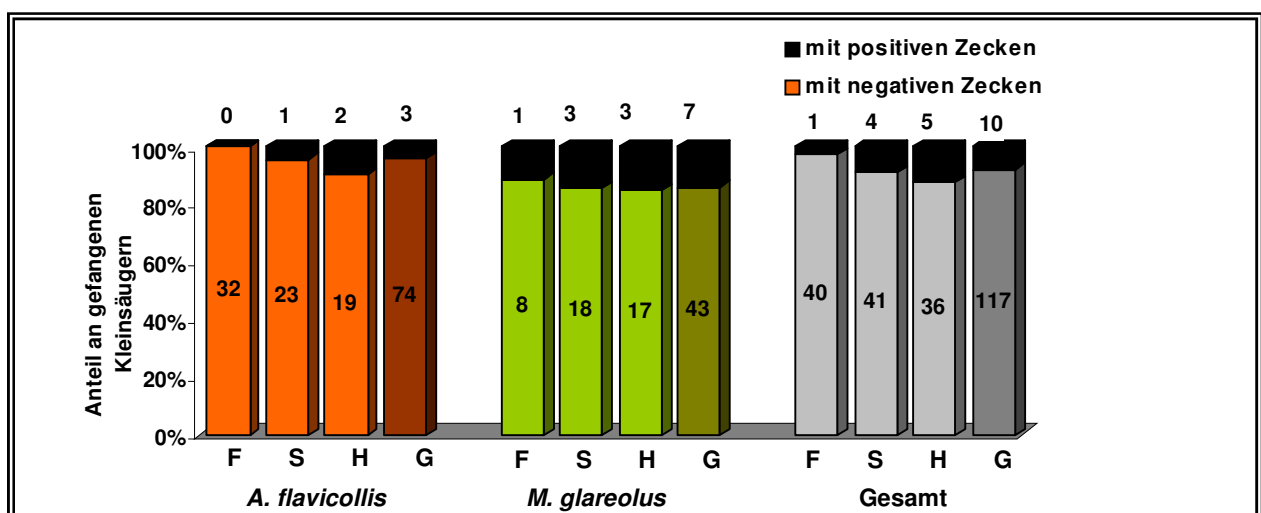


Abb. 4.19 Darstellung der Anteile von Kleinsäugern mit positiven Larven. Die Zahlen an den Balken geben die absoluten Fangzahlen an. **F**: Frühjahr, **S**: Sommer, **H**: Herbst, **G**: Gesamt.

Bei der Untersuchung der Larven zeigten 10 Proben (2,9%) die entsprechende Bande bei ca. 800bp und wurden mittels RFLP weiter untersucht. Abbildung 4.19 zeigt die Anteile der Kleinsäuger mit positiven Zecken. Bei acht der Proben konnte aufgrund der geringen DNA

Menge keine Genospezies bestimmt werden. Bei einer Zecke wurde *B. afzelii* und bei einer *B. garinii* gefunden. Bei der Untersuchung der Biopsieproben konnte nur eine von 113 Kleinsäufern positiv getestet werden. Mittels RFLP konnte *B. afzelii* bestimmt werden. Diese Probe stammte von einer Rötelmaus, von der ebenfalls eine gesogene Larve als *B. afzelii* positiv getestet wurde.

4.3.4 Untersuchung der Seren mittels IFAT

Untersucht wurden in den Jahren 2001, 2002 und 2004 jeweils 105, 81 und 134 entnommene Blutproben mittels IFAT auf das Vorhandensein borrelienspezifischer Antikörper. Es wurden Antikörpertiter von <1:16 bis 1:1024 festgestellt. Tiere mit einem Titer ab 1:32 wurden als positiv bewertet. 2002 konnte bei *A. flavicollis* sowie auch bei *M. glareolus* ein signifikanter Anstieg der Zahl der Mäuse mit positivem Titer beobachtet werden (Chi-Quadrat-Test; $p < 0,001$). Im Jahr 2004 sanken diese Werte wieder auf den Stand von 2001. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der beiden Arten festgestellt werden (Abb. 4.20).

Beim Vergleich der Durchschnittswerte der Titer von positiven Kleinsäufern der einzelnen Jahre konnte bei *M. glareolus* eine signifikante Zunahme von 2001 (49,1) zu 2002 (97,9) und von 2002 zu 2004 (185,1) festgestellt werden (t-Test; $p = 0,013$; $p = 0,019$). Ein Vergleich der beiden Kleinsäugerarten in dem jeweiligen Untersuchungsjahr erbrachte für alle drei Jahre keine signifikanten Unterschiede.

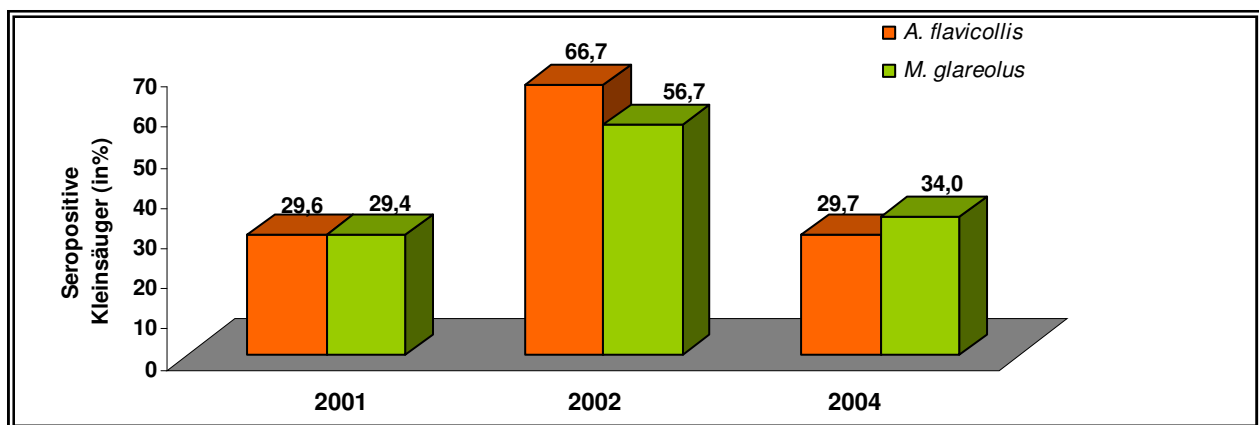


Abb. 4.20 Anteile der Kleinsäuger mit positivem Antikörpertiter gegen *B. burgdorferi* s. l. in den Jahren 2001, 2002 und 2004

Im saisonalen Verlauf konnten weder beim Vergleich der einzelnen Jahre noch beim Vergleich der Kleinsäugerarten Gesetzmäßigkeiten festgestellt werden. Für die Verteilung der Durchschnittstiter konnte in den Jahren 2001 und 2002 eine Abnahme und im Jahr 2004 eine Zunahme der höheren Titer vom Frühjahr bis zum Herbst festgestellt werden. Die Abnahme konnte statistisch nicht bestätigt werden. Der Anstieg vom Frühjahr zum Herbst 2004 war signifikant (t-Test; $p = 0,007$).

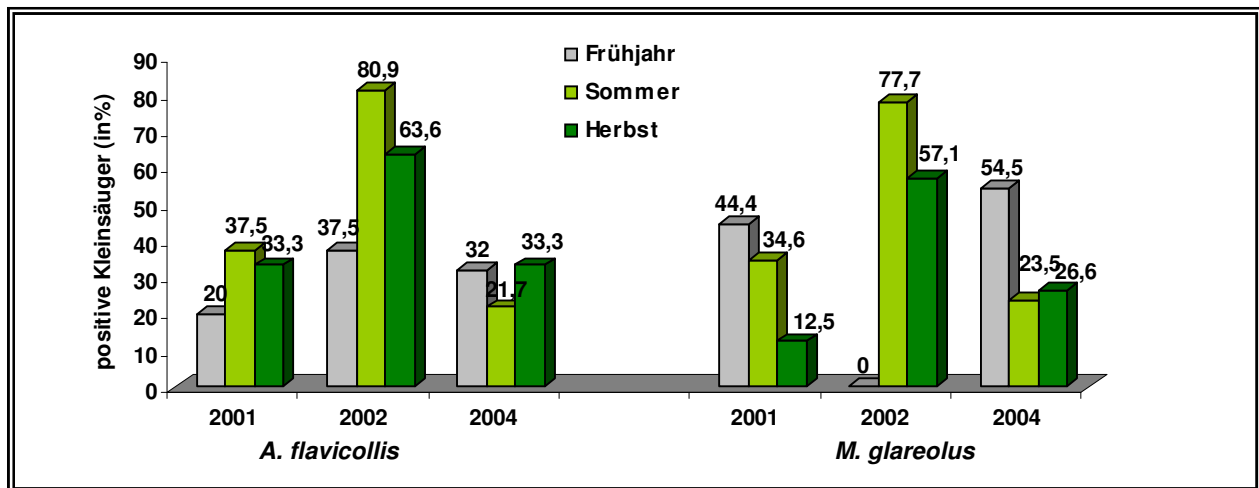


Abb. 4.21 Saisonale Darstellung positiver Kleinsäuger in den Jahren 2001, 2002 und 2004

Ein Zusammenhang zwischen den Infestationsraten und den Titerstufen konnte nicht gefunden werden. Die erhöhte Infestationsrate der Kleinsäuger mit einem Titer von 1:256 war nicht signifikant (Abb.4.22).

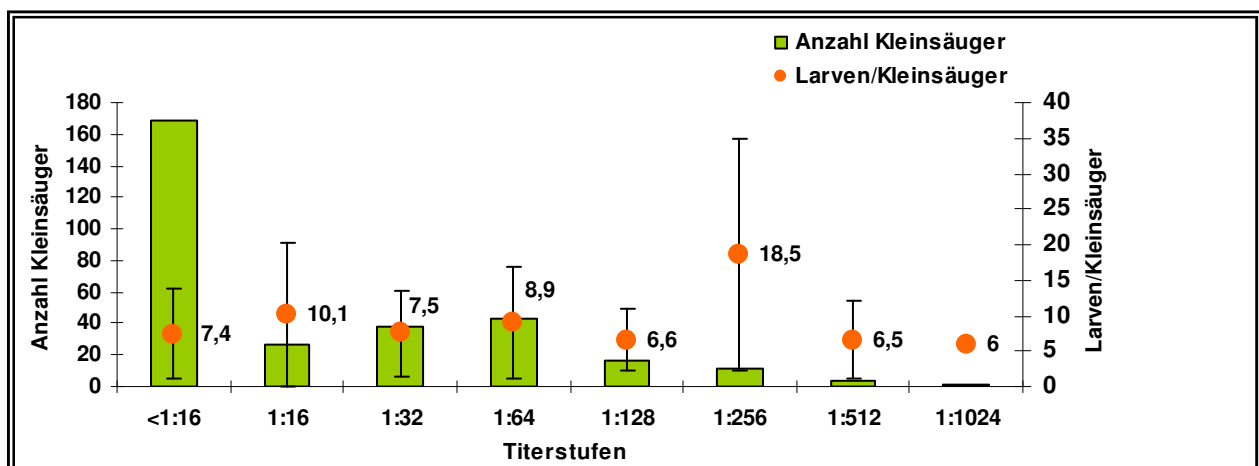


Abb. 4.22 Zusammenhang zwischen den Infestationsraten und den Titern der Kleinsäuger

4.4 Untersuchung der Vögel

4.4.1 Fangdaten und Infestation mit *Ixodes ricinus*

In den Jahren 2004 und 2005 konnten 2303 Vögel aus 39 Arten die im Rahmen des Singvogelmonitorings in den Gebieten Reifenstein, Hütscheroda und Steinberg von den jeweiligen Beringern gefangen wurden, in unsere Untersuchung einbezogen werden. Die gefangenen Arten sind in Tabelle 4.8 dargestellt. Vögel, mit einem oder zwei Exemplaren sind nicht aufgeführt. Insgesamt wurden im Untersuchungszeitraum 915 Zecken (194 Larven, 721 Nymphen) von 254 Vögeln abgesammelt. Die Arten, die am häufigsten mit Zecken infestiert

waren, sind die Amsel (*Turdus merula*) mit 73,9%, gefolgt von der Singdrossel (*Turdus philomelos*) mit 50,6% und der Wacholderdrossel (*Turdus pilaris*), die alle der Familie der Drosselvögel (*Turdidae*) angehören.

Tab. 4.8 Fangdaten der Vögel in Reifenstein, Hütscheroda und Steinberg 2004/2005, Anteil infestierter Vögel und abgesammelter Nymphen und Larven

| Art | | Anzahl | Anteil mit Zecken | Anzahl | Anzahl |
|------------------|--------------------------------------|--------|-------------------|---------|--------|
| | | n | (in%) | Nymphen | Larven |
| Mönchsgrasmücke | <i>Sylvia atricapilla</i> | 276 | 4,71 | 13 | 10 |
| Kohlmeise | <i>Parus major</i> | 273 | 5,86 | 23 | 1 |
| Zilpzalp | <i>Phylloscopus collybita</i> | 166 | 1,2 | 2 | 0 |
| Gartengrasmücke | <i>Sylvia borin</i> | 128 | 3,91 | 5 | 0 |
| Amsel | <i>Turdus merula</i> | 119 | 73,95 | 337 | 103 |
| Klappergrasmücke | <i>Sylvia curruca</i> | 113 | 0,88 | 1 | 0 |
| Blaumeise | <i>Parus caeruleus</i> | 108 | 0 | 0 | 0 |
| Rotkehlchen | <i>Erithacus rubecula</i> | 93 | 22,58 | 35 | 15 |
| Sumpfmeise | <i>Parus palustris</i> | 86 | 0 | 0 | 0 |
| Fitis | <i>Phylloscopus trochilus</i> | 85 | 2,35 | 2 | 1 |
| Heckenbraunelle | <i>Prunella modularis</i> | 79 | 10,13 | 34 | 4 |
| Singdrossel | <i>Turdus philomelos</i> | 79 | 50,63 | 141 | 53 |
| Neuntöter | <i>Lanius collurio</i> | 73 | 0 | 0 | 0 |
| Dorngrasmücke | <i>Sylvia communis</i> | 60 | 16,67 | 18 | 2 |
| Gimpel | <i>Pyrrhula pyrrhula</i> | 54 | 31,48 | 40 | 3 |
| Goldammer | <i>Emberiza citrinella</i> | 51 | 0 | 0 | 0 |
| Baumpieper | <i>Anthus trivialis</i> | 47 | 4,26 | 2 | 0 |
| Grünfink | <i>Carduelis chloris</i> | 45 | 11,11 | 6 | 1 |
| Sumpfrohrsänger | <i>Acrocephalus palustris</i> | 45 | 20 | 12 | 0 |
| Weidenmeise | <i>Parus montanus</i> | 34 | 0 | 0 | 0 |
| Schwanzmeise | <i>Aegithalos caudatus</i> | 30 | 0 | 0 | 0 |
| Feldschirl | <i>Locustella naevia</i> | 27 | 3,7 | 1 | 0 |
| Sperbergrasmücke | <i>Sylvia nisoria</i> | 22 | 0 | 0 | 0 |
| Teichrohrsänger | <i>Acrocephalus scirpaceus</i> | 19 | 5,26 | 1 | 0 |
| Zaunkönig | <i>Troglodytes troglodytes</i> | 19 | 0 | 0 | 0 |
| Buchfink | <i>Fringilla coelebs</i> | 17 | 5,88 | 2 | 0 |
| Kleiber | <i>Sitta europaea</i> | 16 | 12,5 | 3 | 0 |
| Waldbaumläufer | <i>Certhia familiaris</i> | 16 | 0 | 0 | 0 |
| Star | <i>Sturnus vulgaris</i> | 15 | 13,33 | 2 | 1 |
| Kernbeiser | <i>Coccothraustes coccothraustes</i> | 14 | 7,14 | 1 | 0 |
| Wendehals | <i>Jynx torquilla</i> | 14 | 0 | 0 | 0 |
| Buntspecht | <i>Dendrocopos major</i> | 11 | 0 | 0 | 0 |
| Bluthänfling | <i>Acanthis cannabina</i> | 9 | 0 | 0 | 0 |
| Nachtigall | <i>Luscinia megarhynchos</i> | 9 | 0 | 0 | 0 |
| Wacholderdrossel | <i>Turdus pilaris</i> | 9 | 33,33 | 5 | 1 |
| Gebirgsstelze | <i>Motacilla cinerea</i> | 7 | 0 | 0 | 0 |
| Gelbspötter | <i>Hippolais icterina</i> | 7 | 28,57 | 2 | 0 |
| Stieglitz | <i>Carduelis carduelis</i> | 6 | 0 | 0 | 0 |

Hohe Infestationsraten mit 31,5% der gefangenen Tiere zeigte auch der zur Familie der Finken (*Fringillidae*) gehörende Gimpel. Andere Arten, wie z. B. Grasmücken, Heckenbraunelle, Fitis und Zilpzalp, die mit zu den am häufigsten gefangenen Arten gehörten und die sich häufig zur Nahrungsaufnahme am Boden aufhalten, wiesen nur eine geringe oder keine Infestation mit *I. ricinus* auf. Auffällig war die Beobachtung, dass von der Heckenbraunelle (*Prunella modularis*) überwiegend tote Zecken abgesammelt wurden.

Der Befall mit Larven war mit einem Wert von 0,08/Vogel signifikant niedriger als der Befall mit Nymphen, der bei 0,31/Vogel lag (t-Test, $p < 0,001$). Die Arten mit der höchsten Befallsrate waren die Amsel mit 3,7 Zecken pro Vogel und die Singdrossel mit 2,5 Zecken pro Vogel.

Mit 10 Larven und 22 Nymphen wurde die höchste Infestation bei einer Amsel in Reifenstein 2005 gefunden. Die Nymphen zeigten einen Peak der Infestation im Mai, während bei den Larven im Juni die höchste Infestation nachgewiesen wurde. Betrachtet man die saisonalen Befallsraten einiger ausgewählter Vogelarten (Abb. 4.23) ist im Jahr 2005 ein Abfall zum Sommer hin zu verzeichnen. Eine Ausnahme bildet hier die Infestation der Singdrossel mit Nymphen, die keinen Unterschied zwischen Frühjahr und Sommer zeigte.

2004 war ein deutlicher Abfall der Infestation nur bei den Larven an Amseln zu beobachten. Allerdings konnten im Frühjahr 2004 nur sehr wenige Vögel in die Untersuchung einbezogen werden. Beim Vergleich der Befallsraten für die Jahre 2004/2005 konnte 2005 eine signifikant höhere Infestation sowohl mit Larven als auch mit Nymphen festgestellt werden (t-Test, $p < 0,001$).

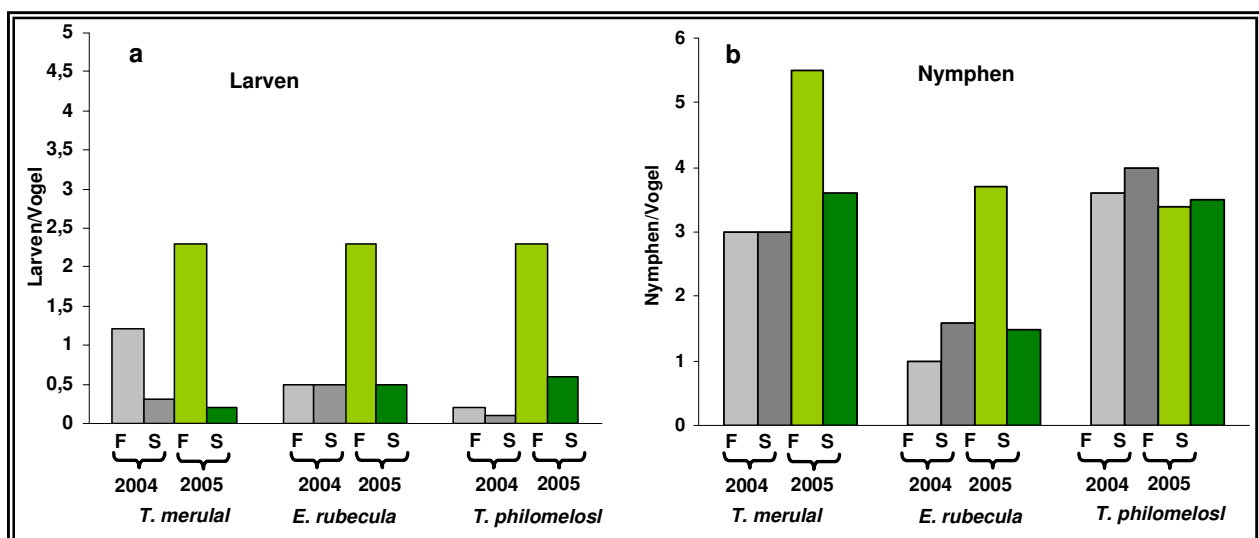


Abb. 4.23 Infestationsraten **a)** der Larven und **b)** der Nymphen von Amsel, Rotkehlchen und Singdrossel in den Jahren 2004 und 2005 im Frühjahr (F) und Sommer (S)

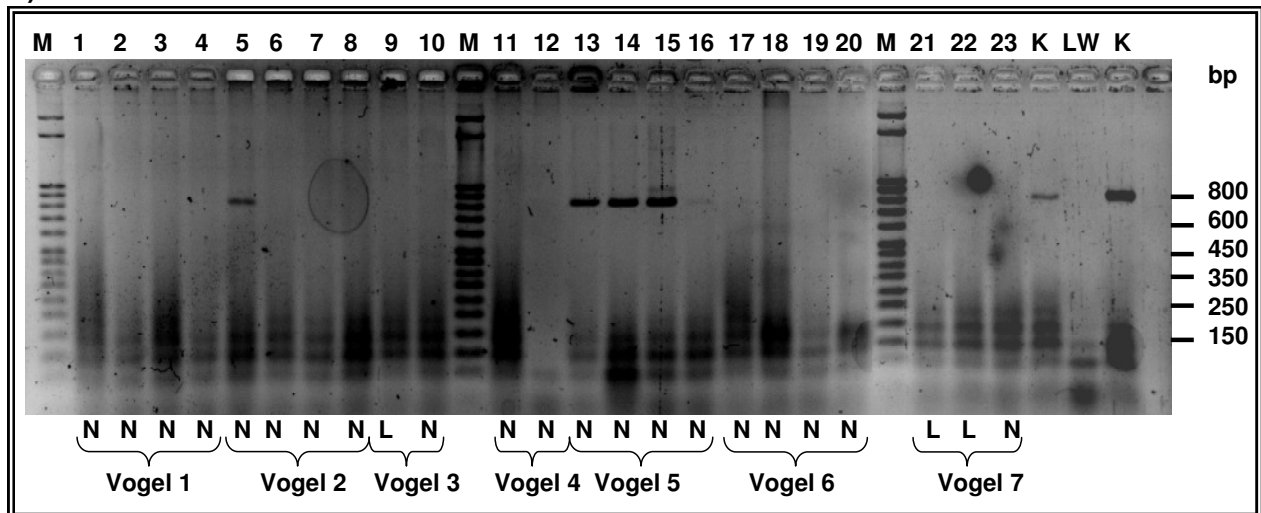
Vergleicht man die Befallsraten für Amseln und Singdrosseln in den verschiedenen Fanggebieten 2004/2005, so zeigt Hütscheroda die höchste mit 5,3 und 3,7 Zecken/Vogel, gefolgt von Reifenstein mit 4,0 und 2,5 Zecken/Vogel und Steinberg mit 2,5 und 0,9 Zecken/Vogel.

4.4.2 Durchseuchung der gesogenen Zecken mit *Borrelia burgdorferi* s. l.

In die Untersuchung mittels *OspA*-PCR wurden alle 656 gesogenen Zecken (117 Larven und 539 Nymphen) einbezogen. Ungesogene oder nur leicht angesogenen Zecken wurden nicht untersucht, da angenommen werden muss, dass eine Transmission des Erregers noch nicht

stattgefunden hat. In Abbildung 4.24a ist ein Gel der *OspA*-PCR (a) und der anschließenden Restriktion (b) dargestellt.

a)



b)

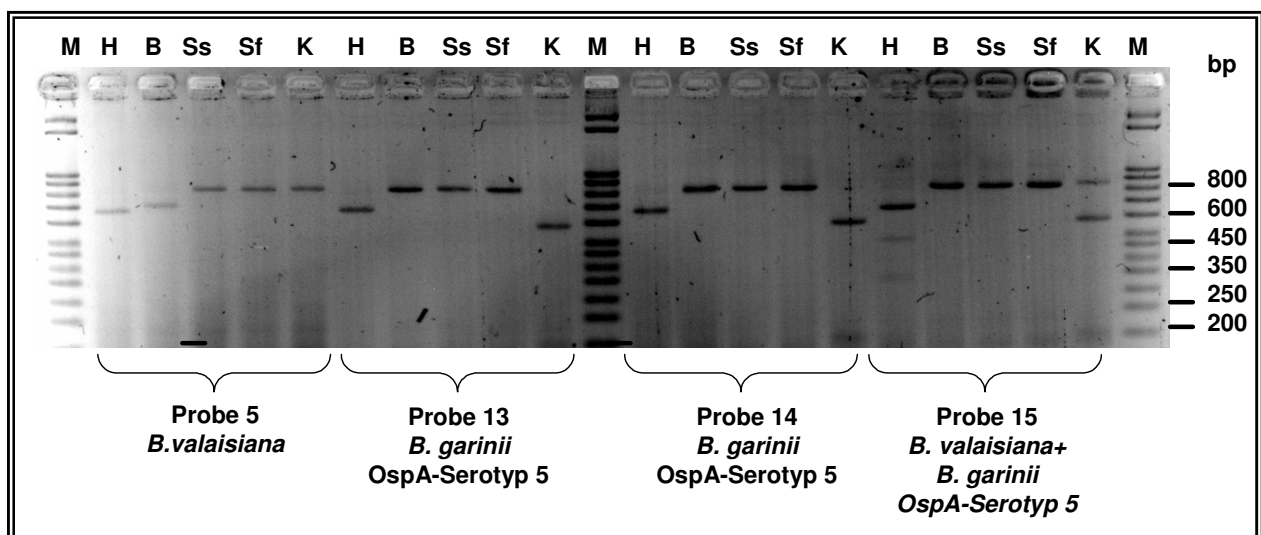


Abb. 4.24 Darstellung eines Beispiels für die Untersuchung der Vogelzecken mittels **a)** *OspA* PCR und **b)** anschließender RFLP. Untersucht wurden die Zecken von sieben Vögeln aus Hütscheroda vom 12.06.05. **M:** DNA-Längenstandard (50bp-Leiter); **H:** Restriktionsenzym HindIII; **B:** Restriktionsenzym BglII; **Ss:** Restriktionsenzym SspI; **Sf:** Restriktionsenzym SfuI; **K:** Restriktionsenzym Kpn2I; **N:** Nymphen; **L:** Larven.

Bei 119 der untersuchten Zecken konnte die typische Bande bei ca. 800bp nachgewiesen werden. Acht Zecken zeigten eine untypische Bande bei 400bp. Insgesamt ergibt sich eine Prävalenz der von Vögeln abgesammelten Zecken von 19,4%. Beim Vergleich der Entwicklungsstadien von *I. ricinus* wurden nur geringe Unterschiede in der Prävalenz gefunden (Larven 20,7%, Nymphen 19,3%).

4.4.2.1 Borrelien-Infektion in Abhängigkeit von der Art

Positive Zecken wurden an acht verschiedenen Vogelarten gefunden. In Abb. 4.19a wird die *B. burgdorferi* s. l.-Prävalenz der abgesammelten Zecken der einzelnen Arten dargestellt. Das Verhältnis von Vögeln mit positiven Zecken zur Gesamtfangzahl der jeweiligen Art zeigt Abbildung 4.25b.

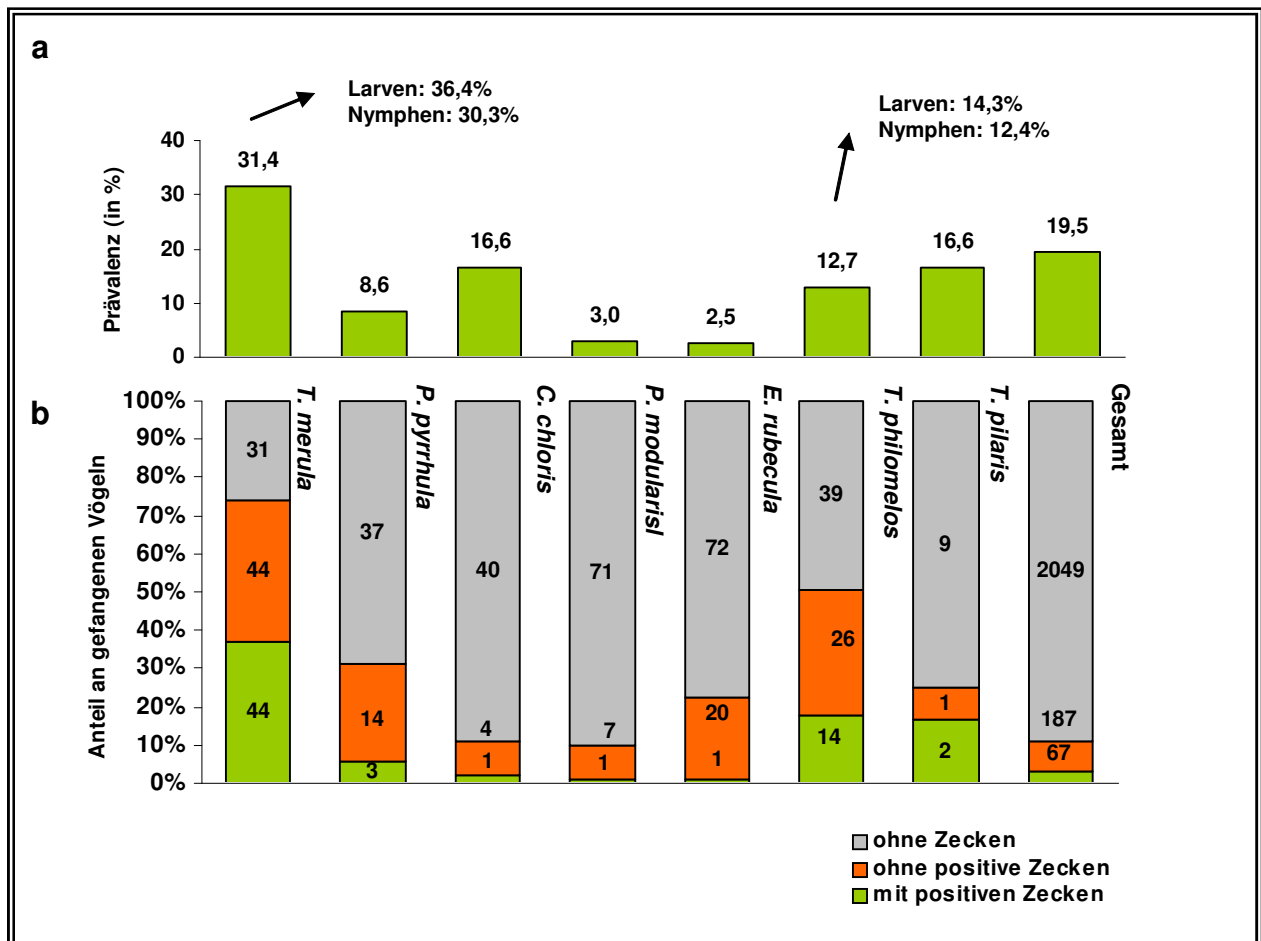


Abb. 4.25 a) Borrelienprävalenz in den abgesammelten Zecken unterschiedlicher Vogelarten 2004/2005 b) Darstellung der Anteile von Vögeln mit positiven und negativen Zecken. Die Zahlen in den Balken geben die absoluten Fangzahlen der Vögel an.

Positive Larven konnten nur von Amseln und Singdrosseln abgesammelt werden. Ein Vergleich der Prävalenzen von Larven und Nymphen zeigte bei beiden Arten eine etwas höhere Prävalenz der Larven gegenüber den Nymphen (siehe Abb. 4.25a). Ebenfalls nur bei diesen beiden Arten wurden mehrere Zecken eines Vogels positiv auf Borrelien getestet. So zeigten 45,5% (20 von 44) der Amseln mit positiven Zecken mehr als eine positive Zecke. Bei den Singdrosseln waren es 21,4% (3 von 14).

4.4.2.2 Borrelien-Infektion in Abhängigkeit vom Fangort und der Zeit

Beim Vergleich der Borrelienprävalenz der Vogelzecken in den unterschiedlichen Gebieten zeigten sich teilweise erhebliche Unterschiede. Die Gesamtprävalenz der abgesammelten Zecken war in Reifenstein 2004 und 2005 höher als in den beiden anderen Gebieten. Signifikant war diese höhere Prävalenz nur im Jahr 2004 (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,001$). Bei Betrachtung der einzelnen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* (Abb. 4.26) zeigten sowohl die Larven als auch die Nymphen in Reifenstein eine höhere Gesamtprävalenz. Allerdings konnte ein signifikanter Unterschied nur für die Nymphen 2004 festgestellt werden.

Betrachtet man nur die Amsel und vergleicht den prozentualen Anteil von infestierten Tieren und den Anteil der infestierten Vögel mit positiven Zecken der einzelnen untersuchten Gebiete ergibt sich das in Grafik 4.27 dargestellte Bild.

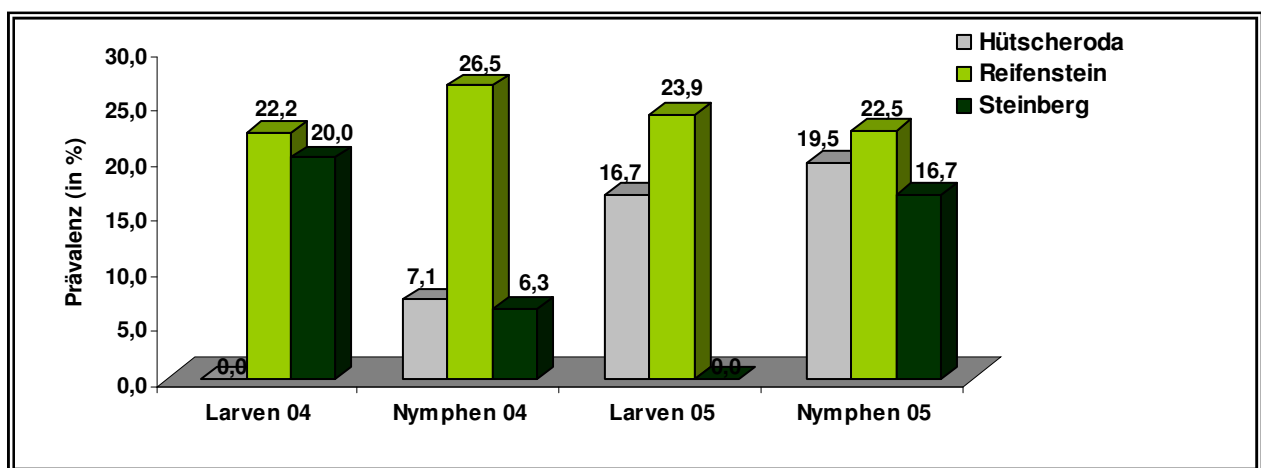


Abb. 4.26 Darstellung der Borrelien-Prävalenz der einzelnen Entwicklungsstadien in von Vögeln abgesammelten Zecken in den Untersuchungsgebieten in den Jahren 2004 und 2005.

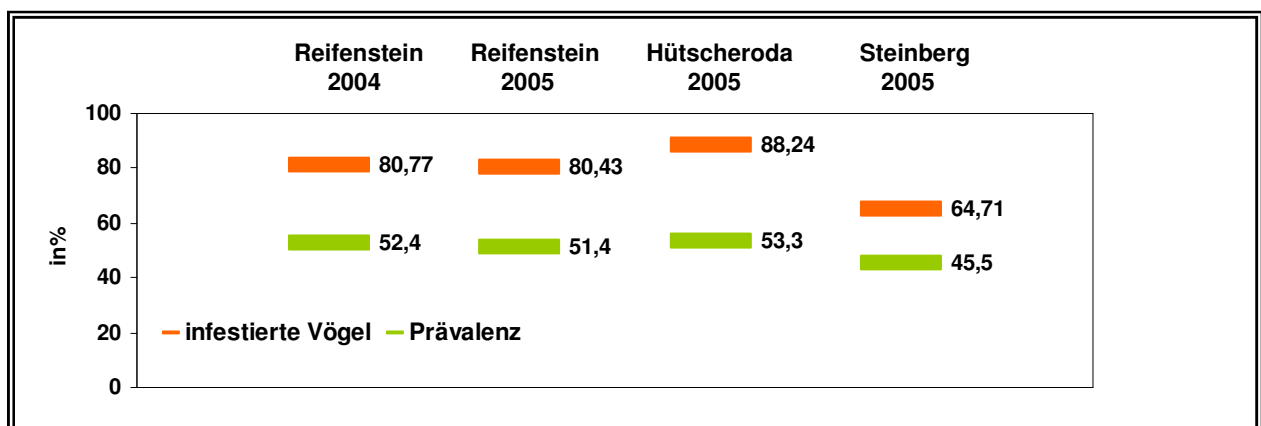


Abb. 4.27 Darstellung der Infestationsraten und Borrelien-Prävalenz von Amseln in den Untersuchungsgebieten der Jahre 2004 und 2005. (Aufgrund der geringen Fangzahlen für Amseln in Hütscheroda und Steinberg 2004 wurden diese Daten nicht dargestellt.)

Dabei zeigt sich, dass in Hütscheroda 2005 die höchste Infestation und der höchste Anteil an Vögeln mit positiven Zecken gefunden wurden. Beim Vergleich der Jahre 2004 und 2005 waren keine Unterschiede in der Prävalenz feststellbar. Zu erkennen war eine Korrelation zwischen dem Anteil infestierter Vögel und der Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. in den abgesammelten Zecken, d.h. je höher der Anteil infestierter Vögel umso höher die Prävalenz in den abgesammelten Zecken.

Betrachtet man die Infestationsraten und die *B. burgdorferi* s. l.-Prävalenz von Amseln und Singdrosseln saisonal, kann dagegen kein Zusammenhang festgestellt werden (Abb. 4.28). Aufgrund der Trockenheit und hohen Temperaturen 2005 sank die Infestation mit Larven im Juli und August stark ab. Die Prävalenz der Nymphen stieg in beiden Jahren zum Sommer hin an, blieb dann 2004 auf demselben Niveau und sank 2005 tiefer als die Frühjahrs-Prävalenz. Signifikant war nur der Anstieg vom Frühjahr zu Sommer/Herbst 2004 ($p=0$; Chi-Quadrat-Test). Bei den Larven konnte 2004 ein Anstieg der Prävalenz gefunden werden. Im Gegensatz dazu sank sie 2005 ab. Aufgrund der geringen Anzahlen bei den untersuchten Larven können keine Aussagen zur Signifikanz getroffen werden.

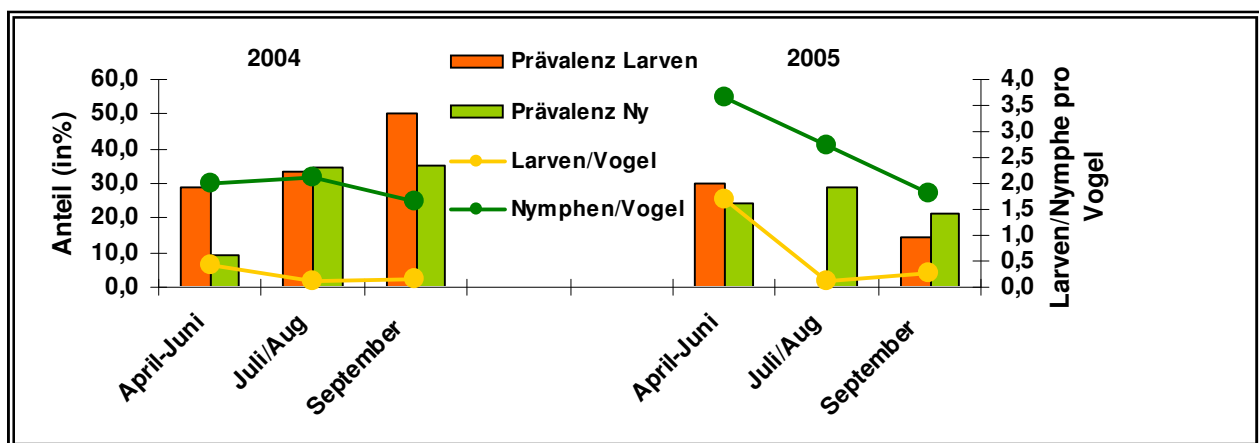


Abb. 4.28 Saisonale Darstellung der Infestation/Vogel und Borrelien-Prävalenz von Amseln und Singdrosseln (im Juli und August konnten keine Larven von Amseln abgesammelt werden)

4.4.3 Spezies-Differenzierung und OspA-Subtypisierung

4.4.3.1 Spezies- und Subspezies in Abhängigkeit vom Fangort

Alle 119 Zecken, die nach der PCR eine Bande bei ca. 800bp zeigten, wurden mittels RFLP weiter untersucht. Bei den acht Proben mit einer Bande bei 350bp wurde mittels Sequenzierung eine Typisierung versucht. Eine Bestimmung der Genospezies war bei allen Restriktionsmustern möglich. Proben die das Schnittmuster von *B. valaisiana* oder *B. spielmanii* zeigten wurden mittels Sequenzanalyse weiter charakterisiert. Hier konnte bei allen Proben gezeigt werden, dass es sich um *B. valaisiana* Typ 2 handelt. Die Untersuchung ergab dass *B.*

garinii mit 70,4% die häufigste Genospezies in von Vögeln abgesammelten Zecken war, gefolgt von *B. valaisiana* mit 23,8%. *Borrelia afzelii* konnte nur in einer Zecke aus Reifenstein (0,7%) nachgewiesen werden. 4,9% zeigten die Bande bei ca. 350bp. Vergleicht man die einzelnen Untersuchungsgebiete, war *B. garinii* mit 50,0%, 70,4% und 79,4% immer die häufigste Genospezies. *B. valaisiana* variierte von 17,4%, 22,5% bis 50,0%. In Hütscheroda konnte der *B. valaisiana* Typ 2 nicht gefunden werden (Tab. 4.9).

Mischinfektionen ließen sich in 21,3% der Zecken nachweisen. Am häufigsten war ein Mix aus *B. garinii* OspA-Serotyp 5 und Serotyp 6 mit 37,0%. Des Weiteren fand sich drei Mal die Kombination der beiden *B. valaisiana* Typen (11,1%) und zwei Mal ein Mix von *B. garinii* und *B. valaisiana* (7,4%). Vergleicht man die Mehrfachinfektionen der abgesammelten Zecken eines Vogels so zeigt sich *B. garinii* deutlich häufiger in 73% der Vögel als *B. valaisiana* in 27%.

Tab. 4.9 Verteilung der Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. in von Vögeln abgesammelten Zecken. Mischinfektionen wurden zur besseren Darstellung getrennt betrachtet. **ss:** sensu stricto; **nb:** nicht bestimmbar

| Genospezies | OspA-Serotyp | Hütscheroda | | Reifenstein | | Steinberg | |
|---------------------------|--------------|-------------|------|-------------|------|-----------|------|
| | | n | % | n | % | n | % |
| <i>B. burgdorferi</i> ss | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>B. afzelii</i> | 2 | 0 | 0 | 1 | 1,0 | 0 | 0 |
| <i>B. garinii</i> | 3-8 | 27 | 79,4 | 69 | 70,4 | 6 | 50,0 |
| OspA-Serotypen | 3 | 1 | 2,9 | 1 | 1,0 | 0 | 0 |
| | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 6 | 17,7 | 8 | 8,2 | 1 | 8,3 |
| | 6 | 20 | 58,8 | 58 | 59,2 | 4 | 33,4 |
| | 7 | 0 | 0 | 1 | 1,0 | 0 | 0 |
| | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | nb | 0 | 0 | 1 | 1,0 | 1 | 8,3 |
| <i>B. valaisiana</i> | | 6 | 17,7 | 18 | 18,4 | 5 | 41,7 |
| <i>B. valaisiana</i> Typ2 | | 0 | 0 | 4 | 4,1 | 1 | 8,3 |
| unbekannt | | 1 | 2,9 | 6 | 6,1 | 0 | 0 |

4.4.3.2 Spezies und Subspezies in Abhängigkeit von der Art

Vergleicht man die Genospezies der von Amseln und Singdrosseln abgesammelten Zecken (Abb.4.29) können keine Unterschiede in den Verhältnissen der Genospezies festgestellt werden. Unterschiede zeigten sich bezüglich der *B. garinii* OspA-Serotypen. In Singdrosseln wurden die OspA-Serotypen 3,6,7 und der zur *B. garinii*-Gruppe gehörende Typ Ba52 gefunden. Nicht bestimmt werden konnte hier Serotyp 5, der aber in Amseln mit 12,3% häufig

war. Serotyp 3 und 7 fehlten hier. Von Singdrosseln wurden insgesamt nur vier Larven untersucht. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse nicht repräsentativ.

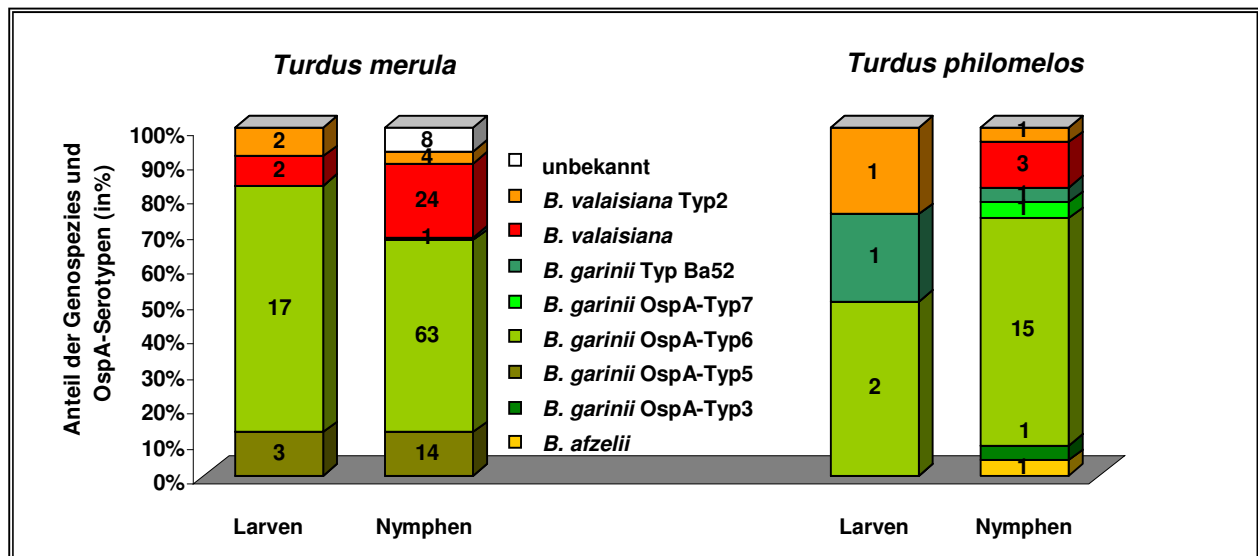


Abb. 4.29 Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. in von *Turdus merula* und *Turdus philomelos* abge-sammelten Larven und Nymphen. Die Zahlen in den Balken geben die tatsächlichen Zeckenzahlen an.

Bei den anderen Vogelarten konnte jeweils in einer Nymphe von einem Buchfink, einem Grünfink und einer Heckenbraunelle *B. valaisiana* und in einer Nymphe von einem Rotkehlchen *B. garinii* OspA-Serotyp 6 gefunden werden. Von drei Gimpeln konnte jeweils eine Nymphe, infiziert mit *B. garinii* OspA-Serotyp 3, 5 und 6, abge-sammelt werden. Zwei Nymphen von zwei Wacholderdrosseln zeigten eine Infektion mit *B. garinii* OspA-Serotyp 5 und Serotyp 6. Das PCR-Produkt der acht Zecken, welche eine atypische Bande bei ca. 350bp zeigten, wurde sequenziert und Vergleiche mit der Gen-Bank zeigten die größte Übereinstimmung mit *B. valaisiana*.

4.5 Infektionen des Menschen mit Lyme Borreliose und Korrelation klinischer Symptome mit dem Erregerspektrum in nüchternen und gesogenen Zecken

4.5.1 Lyme Borreliose Erkrankungen in Thüringen

In den Jahren 2003 und 2004 wurden 510 Erkrankungsfälle beim Gesundheitsamt gemeldet. Alle Fälle waren definierte Lyme Borreliose-Fälle laut der Definition des RKI (www.RKI.de). Fälle von Spätmanifestationen wie die Lyme Arthritis oder die ACA gehören nicht zu dieser Definition und wurden nicht mit erfasst. Festgestellt werden konnten bis zu drei Symptome bzw. Manifestationen pro Patient. Insgesamt fanden sich 491 Patienten (96,3%) mit einer

Manifestation, 16 (3,1%) mit zwei Manifestationen und drei Patienten mit 3 Manifestationen. Einen Peak der Erkrankungsfälle zeigte in beiden Jahren der Sommer (Abb. 4.30).

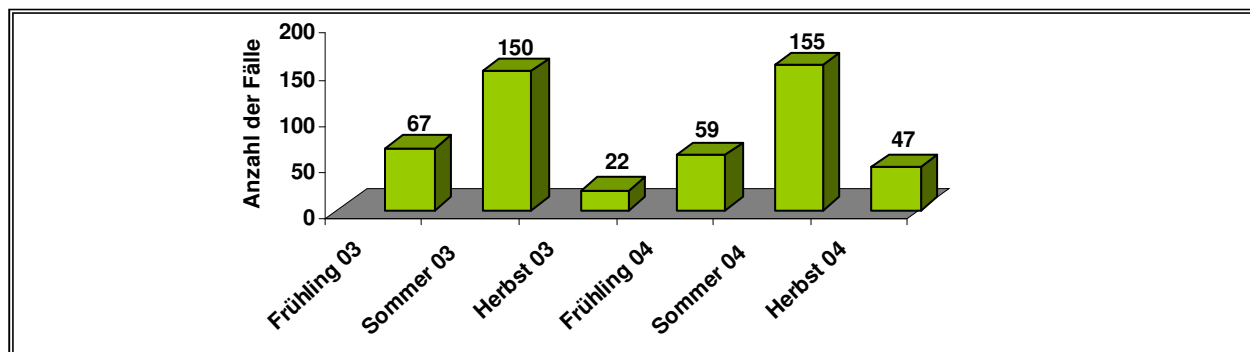


Abb. 4. 30 Saisonale Verteilung der Borreliose-Erkrankungen in den Jahren 2003 und 2004

Die Darstellung der Altersverteilung zeigt eine Häufung der Fälle bei den 1-10 jährigen und 41-70 jährigen (Abb. 4.31).

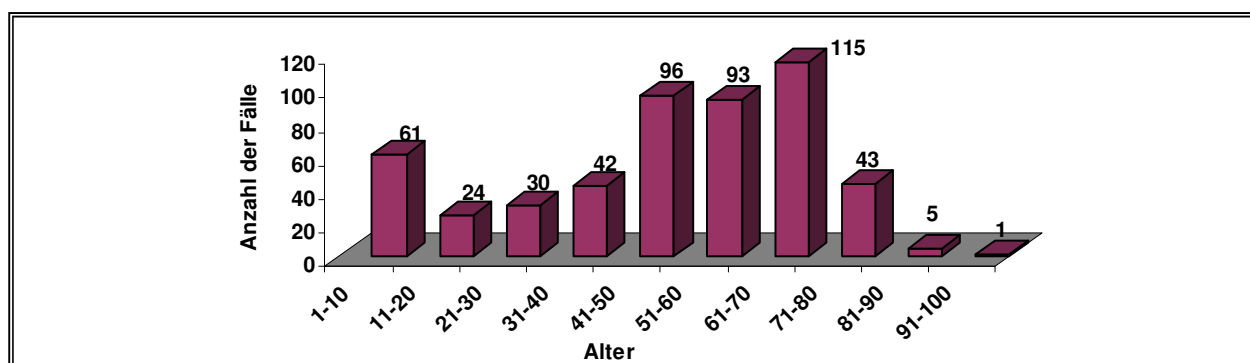


Abb. 4. 31 Verteilung der Borreliose-Erkrankungen nach dem Alter der Patienten

Die häufigste gemeldete Manifestation war mit 92,5% das Erythema migrans gefolgt von der Neuroborreliose mit 4,5%, Gliederschmerzen mit 1,5%, Meningitis mit 0,8%, Radikuloneuritis mit 0,6% und Enzephalitis mit 0,2%.

Die Orte der Erkrankungsfälle sind über ganz Thüringen verteilt, allerdings gibt es starke regionale Unterschiede in den Häufigkeiten. So fanden sich in Nordthüringen sehr geringe und in Süd- und Ostthüringen sehr hohe Fallzahlen (Abb. 4.32).

4.5.2 Vergleich der Krankheitsfälle mit den Prävalenzdaten in freilandgefangenen Zecken

Zum Vergleich der registrierten Fälle mit den Prävalenzraten in freilandgefangenen Zecken wurden die Lyme-Borreliose-Fälle den einzelnen Pools in Thüringen zugeordnet. Wenn man die Prävalenzdaten für *B. burgdorferi* s. l. zusammen mit den Erkrankungsfällen aufträgt, ist keine

Korrelation zu erkennen ($r=0,291$). Eine positive Korrelation zeigt sich, wenn man nur die Prävalenz von *B. afzelii* betrachtet, was mit einem Wert von $r=0,83$ auch statistisch bestätigt werden kann. Ausnahme bildet hier das Saale-Ilm-Tal, wo der Maximalwert der Erkrankungsfälle nicht dem der Prävalenz entspricht (Abb. 4.32).

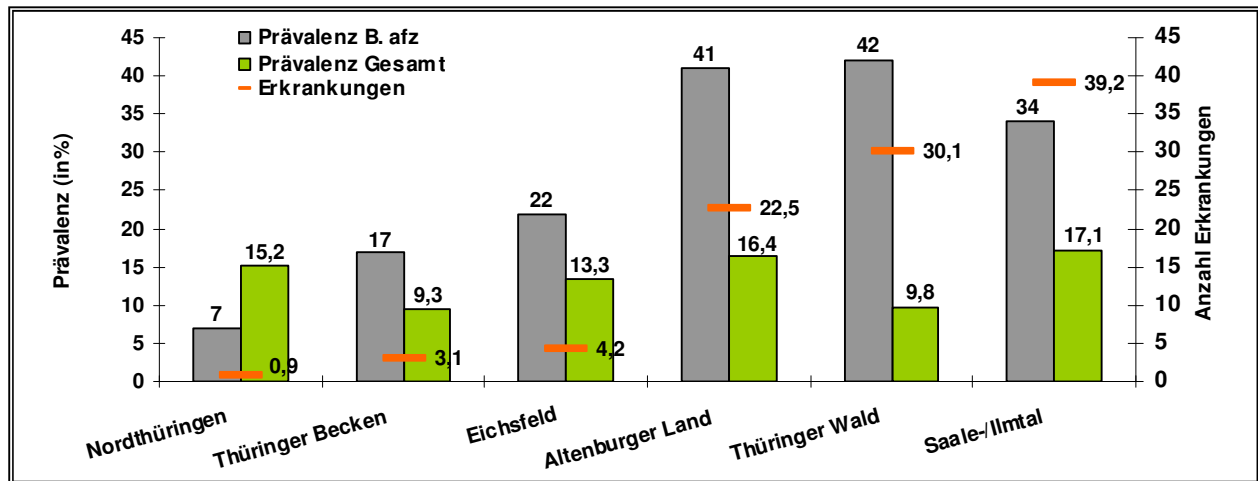


Abb. 4.32 Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. in freilandgefangenen Zecken und Anteile der Erkrankungsfälle in den einzelnen Pools in Thüringen

4.5.3 Untersuchung vom Menschen abgeernteter Zecken

Im Jahr 2004 wurden 622 Zecken von Menschen der Art *I. ricinus* zur Untersuchung bereitgestellt. Mittels *OspA*-PCR wurden 29 Larven, 444 Nymphen, 145 Weibchen und 4 Männchen auf das Vorkommen von *B. burgdorferi* s. l. untersucht. Damit wurden signifikant mehr Nymphen als adulte Tiere am Menschen gefunden ($p<0,001$, Chi-Quadrat-Test). Bei der saisonalen Verteilung der abgenommenen Zecken zeigte sich ein Peak aller Stadien im Juni (Abb. 4.33).

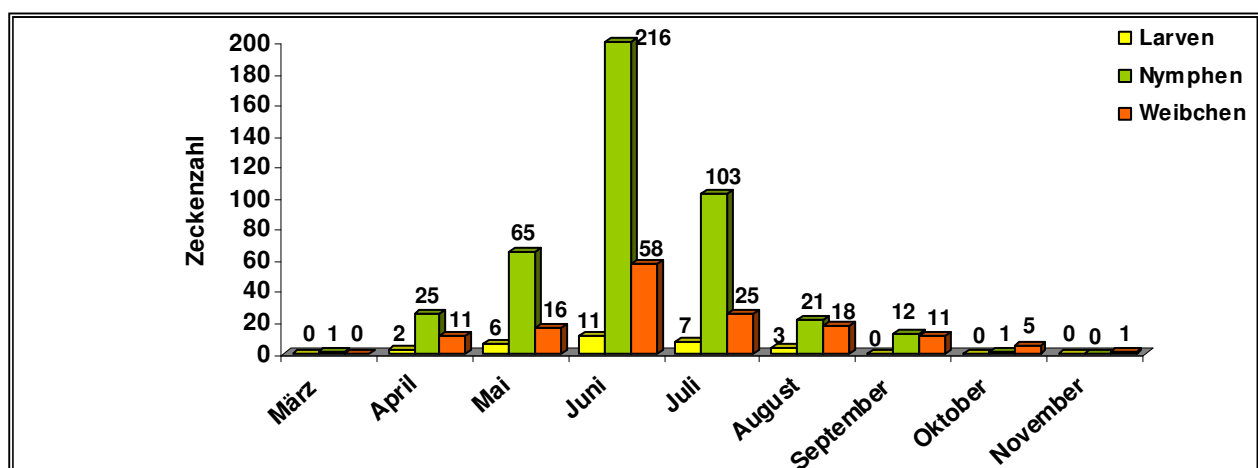


Abb. 4.33 Saisonale Verteilung vom Menschen abgeernteter *I. ricinus* Zecken

Während von April bis Juni die Nymphen am Menschen dominierten, konnten im August und September vergleichbare Anteile von Nymphen und Weibchen gefunden werden. Im Oktober waren Weibchen häufiger als Nymphen. Beim Vergleich der eingelieferten Zecken aus den einzelnen Landkreisen zeigte sich, dass, mit Ausnahme des Saale-Orla-Kreises und Suhl, der überwiegende Anteil der Zecken (68,9%-82,9%) im Frühjahr abgesammelt wurde. Im Saale-Orla-Kreises und Suhl wurde je eine Hälfte der Zecken im Frühjahr und im Sommer am Menschen gefunden.

Bei 38 der Zecken ergab sich ein positives Ergebnis, was einer Gesamtprävalenz an *B. burgdorferi* von 6,1% entspricht. Im Einzelnen sind es 3,4% (1/29) bei den Larven, 4,5% (20/444) bei den Nymphen und 11,7% (17/145) bei den Weibchen, die damit eine signifikant höhere Prävalenz zeigen ($p=0,002$, Chi-Quadrat-Test). Das saisonale Verhältnis der abgenommen Zecken zur gefundenen Gesamtprävalenz zeigt Abbildung 4.34.

Diese stieg vom März bis Juni kontinuierlich an, fiel im August leicht ab und erreichte im September den höchsten Wert. Betrachtet man die einzelnen Entwicklungszustände, zeigten sich Unterschiede in der Saisonalität der Prävalenzen. Während bei den Nymphen die Prävalenz von April bis Juli ansteigt und dann auf null absinkt, sind bei den Weibchen drei Spitzen im April, Juni und Oktober zu erkennen.

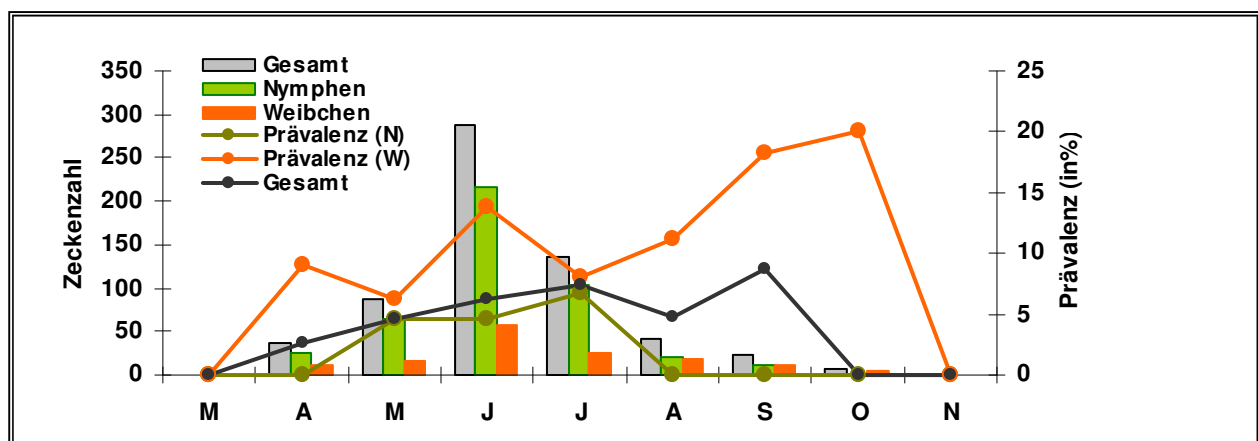


Abb. 4.34 Saisonale Verteilung der Zeckenentnahme vom Menschen und Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. in Thüringen

Die RFLP-Untersuchung der 38 positiven vom Menschen abgesammelten Zecken ergab, dass *B. afzelii* mit 68,4% die häufigste Genospezies war, gefolgt von *B. garinii* mit 15,8% und *B. valaisiana* ebenfalls mit 15,8%. Bei einer Probe war mittels RFLP keine Charakterisierung möglich. Innerhalb der *B. garinii* Gruppe war der OspA-Serotyp 5 die häufigste Subspezies. Eine Mischinfektion von *B. valaisiana* Typ 2 mit *B. garinii* Serotyp 5 konnte in einer Probe nachgewiesen werden (Abb. 4.35).

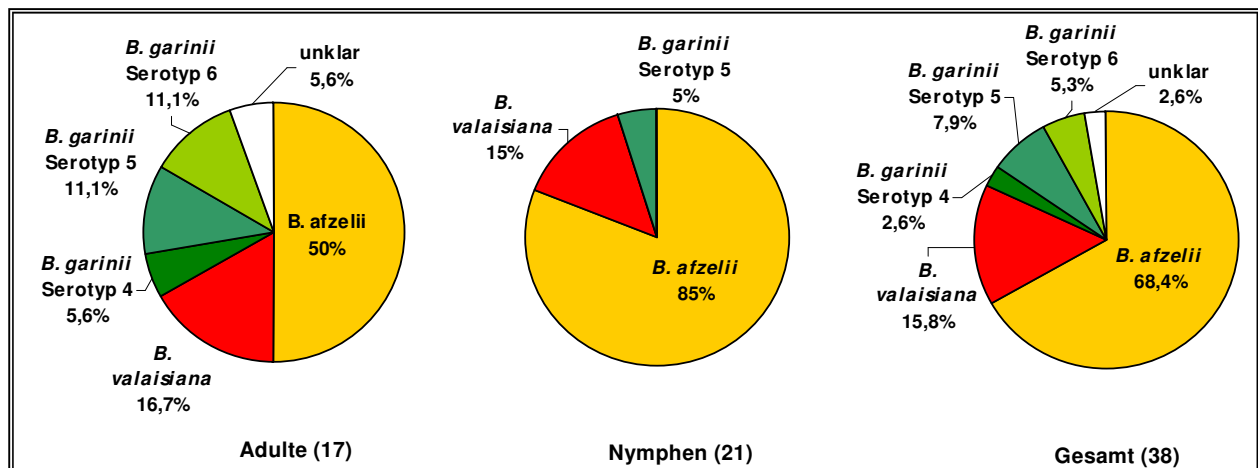


Abb. 4.35 Verteilung der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. und OspA-Serotypen von *B. garinii* in vom Menschen abgesammelten Zecken aus Thüringen

Ein Vergleich der Genospezies in den einzelnen Entwicklungsstadien von *I. ricinus* zeigte deutliche Unterschiede. *B. afzelii* war in Nymphen mit 85% häufiger als in adulten Zecken mit 49%. *B. valaisiana* und alle OspA-Serotypen von *B. garinii* waren in adulten Zecken häufiger zu finden.

In den freilandgefangenen Zecken konnten deutliche Unterschiede in der Genospeziesverteilung im Vergleich zu den Patientenzecken festgestellt werden. So war in Patientenzecken des Saale-Ilmtals der Anteil an *B. afzelii* mit 67,5% fast doppelt so hoch wie in den freilandgefangenen Zecken desselben Gebietes (Abb. 4.36).

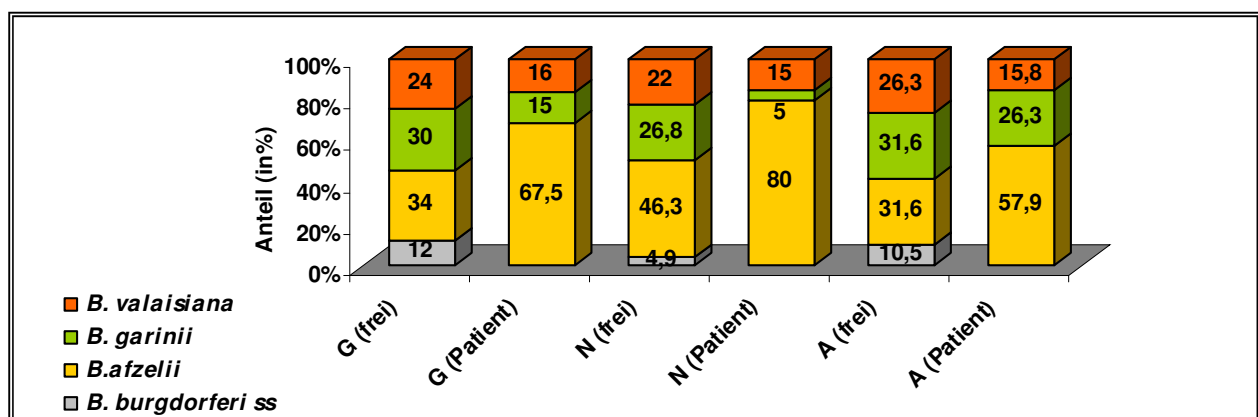


Abb. 4.36 Verteilung der Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. in freilandgefangenen und vom Menschen abgesammelten Zecken des Saale-Ilmtals. G: Gesamt; N: Nymphen; A: Adulte

5 DISKUSSION

5.1 Charakterisierung von *B. burgdorferi* s. l. Kulturen

Ziel dieser Studie war die Differenzierung der Genospezies und OspA Serotypen von 121 *B. burgdorferi* s. l. -Isolaten aus freilandgefangenen Zecken verschiedener Habitate in Thüringen, wo Borrelieninfektionen endemisch sind. In einer vorausgegangenen Untersuchung wurden diese Stämme als *B. burgdorferi* s. l. charakterisiert (Steil et al., 2002). Auf der Suche nach einem effektiven Impfstoff ist ein grundlegendes Wissen der Epidemiologie der Geno- und Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. unabdingbar. Der Vorteil der Untersuchung von Kulturen liegt in der ausreichend vorhandenen DNA-Menge für genetische Untersuchungen. Zur Bestimmung der *B. burgdorferi* s. l. -Spezies wurden verschiedene Methoden der Genotypisierung entwickelt, welche allerdings nur die Genospezies bestimmen (Demaerschalk et al., 1995; Liveris et al., 1999; Rijpkema et al., 19972). Die genetische Analyse mittels PCR-RFLP des *OspA*-Gens nach Michel et al. (2003) ist eine sehr spezifische und sensitive Methode, welche die Charakterisierung auf Serotypebene mit einer relativ einfachen Methode erlaubt. Anhand dieser Methode konnten die Genospezies und Serotypen von 112 (92,6%) der Isolate bestimmt werden. Die am häufigsten gefundene Genospezies als Einfach- und Mischinfektion war *B. garinii* mit 52,9% gefolgt von *B. burgdorferi* sensu stricto mit 21,5%. *B. afzelii* und *B. valaisiana* Isolate waren mit 5% und 11,6% selten. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte die Verteilung der Genospezies in Bad Berka mittels PCR direkt aus Zecken ein abweichendes Muster. Hier war *B. afzelii* die dominante Genospezies (siehe 3.2.2.). Wie auch schon andere Autoren (Gern et al., 1999; Liveris et al., 1999; Saint Giron et al., 1998; van Dam et al., 1993) können auch wir annehmen, dass unterschiedliches Wachstum und unterschiedliche Überlebensraten der verschiedenen Genospezies in Kultur zu einer Dominanz bestimmter Stämme führen kann. Bei der Isolierung der Stämme konnte beobachtet werden, dass *B. afzelii* und *B. valaisiana* wesentlich langsamer wuchsen als die anderen Genospezies (Steil, 2002). Eine Abweichung von den tatsächlichen Verhältnissen muss bei der Beurteilung der Ergebnisse der Isolierung immer in Betracht gezogen werden.

Im Gegensatz zu *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. afzelii* zeigten die *OspA*-Sequenzanalysen der *B. garinii* Stämme eine große Heterogenität. Die Untersuchung mit monoklonalen Antikörpern und die daraus resultierenden *OspA*-Serotypen zeigten eine Übereinstimmung mit den Sequenzierungsergebnissen (Will et al., 1995; Wilske et al., 1996a; Wilske et al., 1996b). In unserer Untersuchung war *B. garinii* *OspA*-Serotyp 6, wie auch in den meisten anderen Studien (Lottmann et al., 1996; Michel et al., 2003; Wilske et al., 1996b), der am häufigsten gefundene Serotyp mit 73,4%. Die Serotypen 3, 5 und 7 waren weniger häufig mit 14,1%, 7,8% und 10,7%, was in Übereinstimmung steht mit klinischen Ergebnissen und anderen Isolaten aus freilandgefangenen Zecken in Deutschland (Lottmann et al., 1996; Wilske et al., 1996b). *OspA*-

Serotyp 4, welcher bis jetzt nur direkt mittels PCR aus Zecken und nach Kultur in klinischem Material bestimmt wurde, konnte nicht gefunden werden (Derdakova et al., 2002; Huegli et al., 2002; Lencakova et al., 2006; Michel et al., 2003; Wilske et al., 1996b). Hu et al. (2001) gehen von der Annahme aus, dass die Spirochäten des Serotyp 4 in Zecken nur in geringer Anzahl vorhanden sind und dadurch schlecht in Kultur anwachsen.

Ein geringer Teil der Kulturen (4,1%) war positiv mit zwei verschiedenen Genospezies. Aber dieser Anteil ist nicht repräsentativ für Mischinfektionen in den Zecken, da sich die einzelnen Genospezies und OspA-Serotypen gegenseitig beeinflussen und überwachsen können (Liveris et al., 1999). Auffällig ist eine Häufung von Mischinfektionen der OspA-Serotypen 5 und 6, was die Vermutung nahe legt, dass diese Serotypen bevorzugt zusammen übertragen werden und in Kultur gut zusammen wachsen.

Das *OspA*-Gen von neun Isolaten mit unbekanntem RFLP-Muster wurde sequenziert. Um phylogenetische Zusammenhänge zu bestimmen, wurden die Sequenzen mit denen einiger bekannter Thüringer Isolate und Sequenzen der Datenbank verglichen. Basierend auf diesen Daten konnten alle Stämme der *B. garinii*-Gruppe zugeordnet werden. Die *OspA*-Sequenzen der Isolate Be9, Be19, Be32 und Be40 mit RFLP-Muster a zeigen eine große Übereinstimmung mit den Strängen PKi und PKa (Wilske et al., 1996a). Zusammen mit diesen CSF-Isolaten bilden sie einen unabhängigen Ast im phylogenetischen Baum. Nach Differenzierungen mit monoklonalen Antikörpern gegen Epitope des OspA wurden die Stämme PKi und PKa als Serotyp 8 bezeichnet (Wilske et al., 1996b). Die Tatsache, dass in Thüringen alle OspA-Serotyp 8-Stämme ausschließlich aus Zecken vom Habitat Belvedere isoliert wurden, lässt vermuten, dass dieser Serotyp nicht über ganz Thüringen verteilt ist. Auch in Isolaten aus freilandgefangenen Zecken oder in Zecken aus Süddeutschland konnte dieser Serotyp nicht gefunden werden, was für ein punkartiges Vorkommen spricht. (Lottmann et al., 1996, Michel et al., 2003). Eine Erklärung hierfür kann, wie auch bei dem mosaikartigen Vorkommen des OspA-Serotyp 4 nicht gegeben werden. Stränge mit den RFLP-Mustern b, c und d zeigten die größte Ähnlichkeit mit *B. garinii* OspA-Serotyp 3. Diese RFLP-Varianten bestätigen die Möglichkeit, dass eine weitere Subdifferenzierung der *B. garinii*-Serotypen möglich ist (Michel et al., 2003). Allerdings ist das pathogene Potential dieser Stämme unklar, da keine dieser Varianten bisher aus klinischem Material isoliert wurde. Bemerkenswert ist, dass die größte Diversität der *B. garinii*-Gruppe im Habitat Belvedere gefunden wurde, woraus wir schlussfolgern, dass ein großes Spektrum an Vögeln hier als Hauptreservoir für die Übertragung und Verteilung der *B. garinii* Serotypen verantwortlich ist. Bei der Untersuchung der von Vögeln abgesammelten Zecken in Nordthüringen konnte nur die RFLP-Variante d (Typ Ba 52) in zwei Fällen gefunden werden, was, wie bei den OspA-Serotypen 8 und 4, auf ein mosaikartiges Vorkommen schließen lässt. Bei den Vogelzecken konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Arten unterschiedlich kompetent für die *B. garinii* Serotypen sind und so nehmen wir an, dass die Abundanz der einzelnen Vogelarten das Serotyp-Muster bestimmt.

5.2 Untersuchung der nüchternen Zecken auf *Borrelia burgdorferi* s. l.

5.2.1 Genospezies und OspA-Typenverteilung in verschiedenen Regionen Thüringens

Die Prävalenz und Genospezieszusammensetzung von *B. burgdorferi* s. l. ist innerhalb Europas und auch in verschiedenen untersuchten endemischen Gebieten Deutschlands sehr heterogen (Hubalek et al., 2003, Michel et al., 2003, Rauter und Hartung, 2005). Für Thüringen existieren nur Daten aus dem Saale-Ilmtal (Hildebrandt et al., 2003, Dorn et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene geografische Regionen mit unterschiedlichen Pflanzengesellschaften in Thüringen auf ihre Unterschiede der Prävalenz und Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. hin untersucht werden. Da zurzeit immer noch an einem Impfstoff gearbeitet wird, sind Daten zur Zirkulation der *B. burgdorferi* s. l. Genospezies und OspA-Serotypen von großer epidemiologischer Bedeutung. (Wilske et al., 1996a).

Dazu wurden im Sommer 2002 an 50 öffentlich genutzten Plätzen 1616 *I. ricinus* Zecken (972 Nymphen, 419 Weibchen und 225 Männchen) gesammelt und mittels *OspA*-PCR-RFLP untersucht. Gebiete mit besonders hohen Zeckendichten wurden in mikroklimatisch begünstigten Habitaten an vereinzelt Stellen gefunden, so z. B. im Stadtpark von Eisenach, der durch seinen gemischten Bewuchs (Laubbäume und Sträucher) einen idealen Platz für Zecken darstellt. In Reizengeschwenda und im Zeitgrund lässt sich die außerordentlich hohe Zeckendichte mit einer hohen Luftfeuchte und günstiger Vegetation erklären, welche den Entwicklungsbedingungen der Zecken sehr gut gerecht werden. Solche Fälle stellen aber regionale Besonderheiten dar, die nicht ohne weiteres auf das umgrenzende Gelände übertragbar sind.

Aufgrund der geografischen Unterschiede in Thüringen wurden alle Fanggebiete in sieben Pools unterteilt. Die durchschnittlichen Prävalenzdaten von 10,2% bei den Nymphen und 22,9% bei den Adulten korrespondieren mit den Werten anderer Studien aus Süd- und Mittel-Deutschland (Fingerle et al., 1999, 2004; Hildebrandt et al., 2003, Michel et al., 2003, Rauter et al., 2002; Stanczak et al., 2002). Innerhalb der Pools schwankten die Werte jedoch erheblich. Studien in Bayern, den Niederlanden und in Süd-Finnland fanden ebenfalls solche regional differenzierte Verteilungen in der Prävalenz mit Unterschieden von 5 bis 45% (Junttila et al., 1999; Michel et al., 2003; Wielinga et al., 2006). Unsere Untersuchungen zeigten Schwankungen bei den Nymphen von 3,8%-13,3% und bei den Adulten von 10%-28,4%. Die Pools mit der geringsten Durchseuchungsrate sind die Rhön (5,6%), das Thüringer Becken (9,3%) sowie der Thüringer Wald (10,1%). Da in diesen Gebieten zum Sammelzeitpunkt auch eine geringe Dichte an Zecken gefunden wurde, kann man annehmen, dass hier das Risiko einer Infektion gering ist. Von einem hohem bis sehr hohem Risiko muss man in den Regionen Thüringer Holzland/Altenburger Land (17,5%) und Saale-Ilmtal (17,1%) ausgehen. Im Letzteren ist die Infektionsgefahr am höchsten, da wir hier auch die höchsten Zeckendichten fanden. So

konnte z.B. in Reizengeschwenda, einem Ausflugsgebiet an der Talsperre Hohe Warte, mit 26,6% die höchste *B. burgdorferi* s. l. Prävalenz in Thüringen in Verbindung mit einer überdurchschnittlich hohen Zeckendichte von mehreren hundert Zecken/100m² gefunden werden. Die erhöhte Wahrscheinlichkeit bei einer hohen Zeckendichte, dass ein vorhandenes Reserviertier von einer infizierten Zecke gestochen und infiziert wird und die Krankheit an viele Zecken weitergibt, ist eine Erklärung für diesen Zusammenhang zwischen Zeckendichte und Prävalenz. Allerdings ist solch eine Korrelation, wie auch bei und Tälleklint und Jaenson (1996) gefunden, nicht ohne weiteres auf alle Gebiete übertragbar. So konnten bei Zeman und Daniel (1999) sehr unterschiedliche Prävalenzen bei gleicher Zeckendichte beobachtet werden. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen steht auch die bei Gray et al. (1999) gefundene negative Korrelation von Zeckendichte und *B. burgdorferi* s. l.-Prävalenz, welche mit der hohen Dichte an Wild und dem Fehlen kompetenter Reserviertiere erklärt wird. Keine Korrelation zwischen Zeckendichte und der *B. burgdorferi* s. l. Prävalenz fanden Jouda et al. (2004) in der Schweiz. Entscheidend für einen Zusammenhang der beiden Größen ist also das Verhältnis kompetenter und inkompetenter Wirte eines Gebietes.

In Bezug auf die Höhenlage der Fangplätze konnten keine Unterschiede in der Prävalenz beobachtet werden.

Die in dieser Studie häufigste Genospezies war *B. afzelii* mit 33,2% gefolgt von *B. garinii* (29%), *B. valaisiana* (28%) und *B. burgdorferi* sensu stricto (9,8%). Eine unterschiedliche Verteilung der Genospezies konnte in Nymphen und Adulten gefunden werden. Die höhere Prävalenz von *B. afzelii* in den Nymphen erklärt sich aus der Tatsache, dass Larven überwiegend Kleinsäuger als Wirt aufsuchen, und sich mit dieser hier hauptsächlich vorkommenden Genospezies infizieren können und diese bei der Häutung zum Nymphenstadium übernehmen (Kurtenbach et al 1998b). Nymphen dagegen saugen mehr an Vögeln, seltener an Mäusen und aufgrund der Komplementaktivität der Vögel kommt es zu einer Reduktion der *B. afzelii* Prävalenz in den gesogenen Nymphen und späteren Adulten (Kurtenbach et al., 1998b). *B. burgdorferi* sensu stricto zeigt einen gegenläufigen Trend, woraus geschlussfolgert werden kann, dass diese Genospezies durch einen Reservoirwirt übertragen wird, der vorwiegend von Nymphen aufgesucht wird, z.B. Vögel. Auf dieses Thema wird im nächsten Kapitel ausführlicher eingegangen.

Beim Vergleich der einzelnen geografischen Regionen konnten deutliche Unterschiede in der Verteilung der *B. burgdorferi* s. l. Genospezies festgestellt werden (Abb. 4.15; S.61). Die Ursache hierfür ist mit großer Wahrscheinlichkeit die unterschiedliche Struktur der Habitate und die sich daraus ergebene Zusammensetzungen der Reserviertiere. Das Zirkulieren verschiedener Borrelien-Spezies in Spezies-spezifischen Transmissionszyklen verursacht durch die unterschiedliche Wirkung des Komplements auf die verschiedenen Genospezies wird von vielen Autoren bestätigt (Nakao et al., 1994; Kraiczy et al., 2002, Kurtenbach et al., 1998b, Kurtenbach et al., 2002). Ursache hierfür sind Proteine wie das OspE oder Erp-Proteine, welche

sehr heterogen sind für die einzelnen Genospezies und davon abhängig an Komponenten des Komplementsystems verschiedener Wirte binden. Bei einer erfolgreichen Bindung, können sie dessen Aktivierung verhindern (van Dam et al., 2002; Kraiczy et al., 2006). Im Norden Thüringens (Nordthüringen und Eichsfeld), wo Eichen- Buchenmischwälder dominieren, sind *B. garinii* und *B. valaisiana* die vorherrschenden Genospezies. Diese Genospezies weisen auf eine dominante Rolle der Vögel in diesem Gebiet hin (Olsen et al., 1995; Hanincova et al., 2003; Mannelli et al., 2005). Die Abnahme der *B. afzelii* und Zunahme der *B. garinii* Prävalenz der Adulten im Vergleich zu den Nymphen unterstreicht dieses Erkenntnis. Auch eine Studie in Frankreich zeigte eine Dominanz von *B. afzelii* in den Nymphen und *B. garinii* in den adulten Zecken (Ferquel et al., 2006). Im Mittelgebirge Thüringer Wald mit vorwiegendem Nadelwald waren die meisten Zecken mit *B. afzelii* infiziert. Für diese Genospezies sind Kleinsäuger das Reservoir, die damit in diesem Gebiet das Hauptreservoir darstellen (Humair et al., 1995; Humair et al., 1999; Kurtenbach et al., 1998b). Deutlich wird dies auch an der Tatsache, dass *B. afzelii* in Nymphen sowie auch in adulten Zecken die dominierende Genospezies ist. Vögel spielen hier eine unbedeutendere Rolle als Reservoir. Pichon et al. (2006) führten ihre Prävalenzuntersuchungen ebenfalls in einem Nadel-Mischwald durch und auch hier konnte *B. afzelii* als die dominante Genospezies gefunden werden. *B. burgdorferi* sensu stricto war mit 0% bis 16% in allen Gebieten die Genospezies mit den geringsten Prävalenzen.

Innerhalb der *B. garinii*-Gruppe wurde der Serotyp 6 mit 90,3% am häufigsten nachgewiesen. Mit 8,1% war der *B. garinii* OspA-Serotyp 5 verhältnismäßig selten. Eine ähnliche Verteilung fanden auch Michel et al. (2003), Fingerle et al. (2004) und Lencakova et al. (2006). *B. garinii* OspA-Serotyp 4, für den auch Kleinsäuger das Hauptreservoir darstellen (Hu et al., 2001; Huegli et al., 2002), konnte in ganz Thüringen bisher nur in einer Zecke nachgewiesen werden. Das gehäufte Vorkommen dieses Serotyps in einem einzelnen Gebiet Süddeutschlands spricht für ein regional begrenztes Vorkommen (Michel et al., 2004). Dagegen zeigten Untersuchungen in Polen und der Slowakei eine flächendeckende Präsenz dieses Serotyps. In Nymphen war es hier sogar der zweithäufigste OspA-Serotyp (Lencakova et al., 2006). Die OspA-Serotypen 3 und 7 konnten im Gegensatz zu den untersuchten Kulturen in freilandgefangenen Zecken nicht nachgewiesen werden. Auch Michel et al. (2003) und Lencakova et al. (2006) fanden nur sehr geringe Anteile der Serotypen 3 und 7. Europaweit fehlen aber noch weitere Untersuchungen um genaue Aussagen zur Verteilung der OspA-Serotypen treffen zu können.

Doppelinfectionen zeigten 8,4% (19 von 225) der positiven Zecken zu gleichen Anteilen in Nymphen und Adulten. In einer Studie von Rauter und Hartung (2005), die 44 Untersuchungsergebnisse aus Europa zusammenfasst, konnten in 13% der Zecken Mischinfectionen nachgewiesen werden. Auch hier fanden sich die Mischinfectionen zu gleichen Teilen in Nymphen und Adulten. Die Kombination der von Vögeln übertragenen Genospezies *B. garinii* und *B. valaisiana* und den mit Kleinsäuger assoziierten Spezies *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. afzelii*, die von uns hauptsächlich bestimmt wurden (25% und

35%), fanden auch Kurtenbach et al. (2001) und bestätigen die Hypothese, dass das Komplementsystem des Wirtes innerhalb der Zecke mit den Spirochäten interagiert (Kraiczy et al., 2001; Kraiczy et al., 2002; Kurtenbach et al., 2002a,b,c; Kurtenbach et al., 1998a). Häufig waren auch die Kombinationen von *B. garinii* OspA-Serotyp 5 und 6 (15%) und der beiden *B. valaisiana*-Typen (20%). Mischinfektionen von *B. garinii* OspA-Serotyp 4 mit *B. afzelii*, beides Genospezies des Kleinsäuger-Zyklus, dominierten bei Studien in Bayern, Polen und der Slowakei (Lencakova et al., 2005, Michel et al., 2004).

Diese Daten zur Prävalenz in Thüringen zeigen die Bedeutung einer flächendeckenden Bestimmung für eine Risikoabschätzung und dass die Frage, wo eine Zecke aufgenommen wurde, bei einer ärztlichen Diagnose sehr hilfreich sein kann. Des Weiteren sind solche Untersuchungen nötig um der steigenden Sensibilisierung der Bevölkerung gegenüber dieser Krankheit insbesondere durch die Medien fundierte Angaben zum Vorkommen der Zecke und deren Gefährlichkeit entgegenstellen zu können. Gerade im Zusammenhang mit der globalen Klimaerwärmung, welche besondere Auswirkung auf den wechselwarmen Vektor *I. ricinus* hat, ist die Untersuchung gleicher Habitate über einen längeren Zeitraum von besonderer Bedeutung, um die Einflüsse der klimatischen Veränderung auf die Erreger der Lyme Borreliose zu beobachten (Khasnis und Nettleman, 2005).

5.2.2 Untersuchung zur Saisonalität der Prävalenz und Genospezies in Bad Berka

In den Jahren 2001 und 2004 wurden in Bad Berka zur Untersuchung der Saisonalität von Prävalenz und Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. jeweils 331 Zecken (183 Adulte und 148 Nymphen) und 479 Zecken (225 Adulte und 254 Nymphen) gesammelt und mittels PCR-RFLP des *OspA*-Gens untersucht. Die gefundenen Infektionsraten (2001/2004) betrugen 13,5%/3,9% bei den Nymphen und 19,1%/10,7% bei den Adulten. Mit diesen Werten liegt das Habitat Bad Berka im Bereich der Ergebnisse anderer Studien in Deutschland (Michel et al., 2004; Kampen et al., 2004; Baumgarten et al., 1999; Hildebrandt et al., 2004; Maetzel et al., 2005).

Da das Habitat in Bad Berka schon seit einigen Jahren untersucht wird (Dorn et al., 1999, Steil, 2002), können Aussagen über die Veränderung der Prävalenz getroffen werden (Abb. 5.1). Der Abfall der Prävalenz für die Adulten von 1997 zu 1998 war signifikant ($p < 0,05$; Chi-Quadrat-Test) und ebenso der Abfall der Prävalenz bei den Nymphen und Adulten von 2001 zu 2004 ($p < 0,05$; Chi-Quadrat-Test). Deutliche Unterschiede der Prävalenzen zwischen den Jahren zeigten auch Studien in den Niederlanden von 2000 bis 2004 (Wielinga et al., 2006). Mögliche Ursache für solche Unterschiede ist das schwankende Vorkommen kompetenter Reserviertiere, welche eine wichtige Rolle bei der Verbreitung des Erregers spielen. Korenberg et al. (2003) konnte z.B. zeigen, dass auf ein Populationsmaximum der Kleinsäuger, das alle drei Jahre auftritt, im folgenden Jahr ein Maximum der Borrelienprävalenz folgt. Ebenso spielen

klimate Bedingungen, die die Aktivität der Zecken beeinflussen, eine bedeutende Rolle (Gray et al., 1999; Kahl et al., 2002). Die doch auffällig niedrigeren Werte für 2004 könnten an dem sehr heißen Sommer 2003 und den geringen Temperaturen des Sommers 2004 liegen.

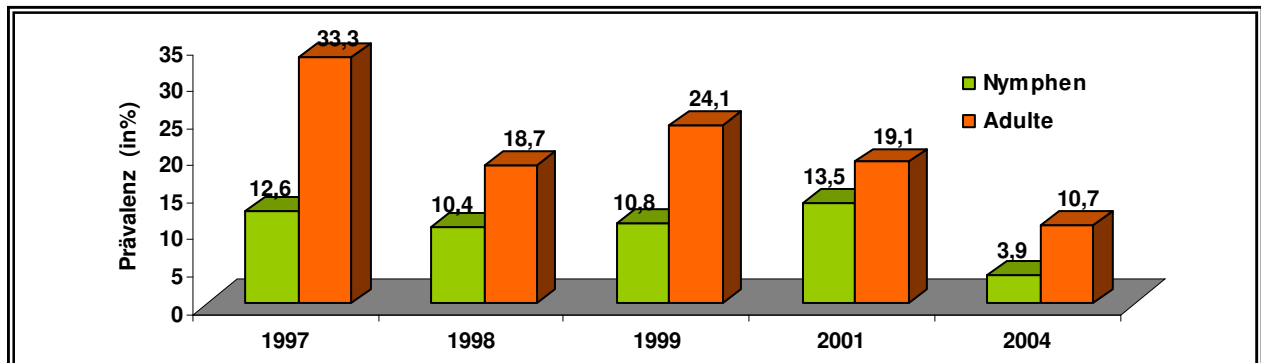


Abb. 5.1 Vergleich der Prävalenzen von *B. burgdorferi* s. l. in Nymphen und Adulten verschiedener Jahre in Bad Berka (Werte für 1997 aus Sünder, 2003; Werte für 1998 und 1999 aus Steil, 2002)

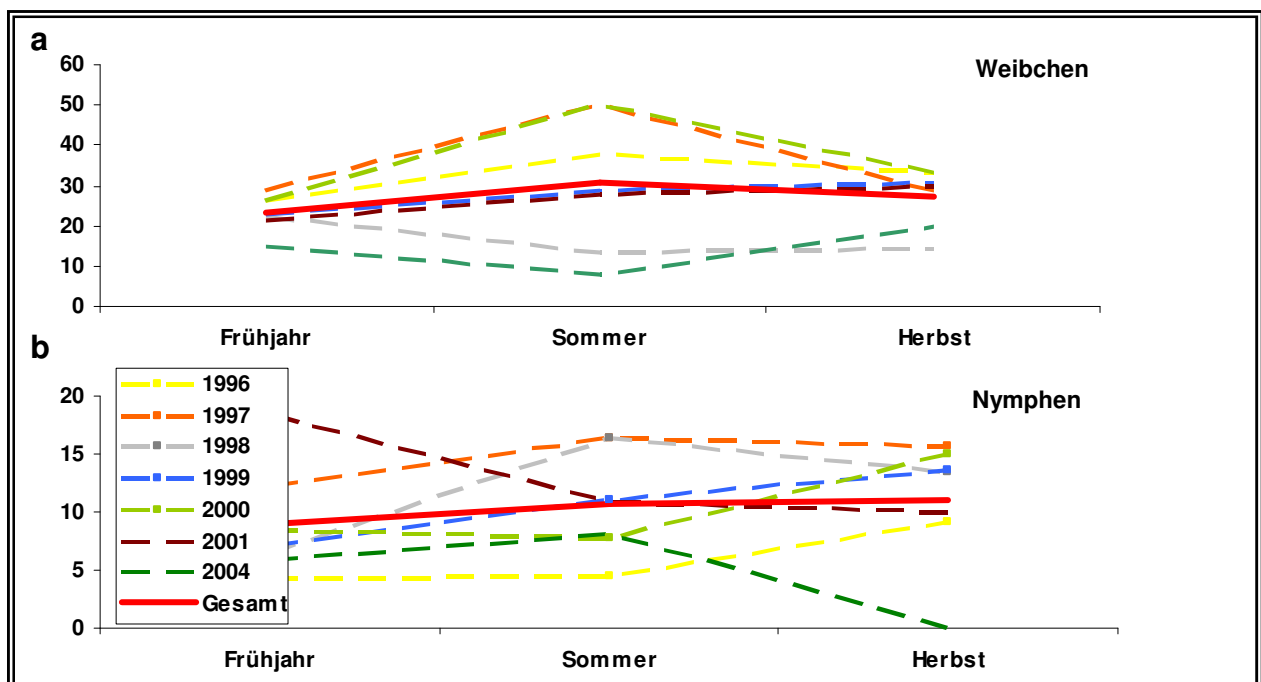


Abb. 5.2 Jahreszeitliche Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. in Bad Berka (1996-2001, 2004) **a)** Weibchen, **b)** Nymphen (Werte für 1997 aus Sünder, 2003; Werte für 1998 und 1999 aus Steil, 2002)

Eine Erhöhung der Zeckendichte durch inkompetente Wirte wie Großwild und damit eine Erhöhung der negativen Zecken wie bei Gray et al. (1999) beschrieben, kann ausgeschlossen werden, da bei der Untersuchung der Mäuse 2004 nur sehr geringe Infestationsraten gefunden wurden und man davon ausgehen kann, dass allgemein eine geringe Dichte vorherrschte. Der saisonale Verlauf der Prävalenz der Entwicklungsstadien von *I. ricinus* in den Jahren zeigt keine Gesetzmäßigkeiten (Abb. 5.2). Eine negative Korrelation der Zeckendichte mit der Prävalenz wie bei Sünder et al. (2003) für die Jahre 1996/97 nachgewiesen, konnte in den anderen Jahren nicht gefunden werden.

Diese unterschiedliche Verteilung der infizierten Zecken in den einzelnen Jahren und Jahreszeiten unterliegt durch die Abhängigkeit von der Populationsentwicklung reservoirkompetenter Wirtstiere und der Witterung, die die Aktivität der Zecken und ihrer Wirte beeinflusst sehr komplexen Mechanismen, die sich ständig verändern (Kurtenbach et al., 1995; Humair et al., 1993; Gray et al., 1998; Eisen et al., 2002). Eine Zusammenfassung aller Untersuchungsjahre ergab sowohl bei den Nymphen als auch bei den Weibchen einen leichten Anstieg der Prävalenz im Sommer und eine leichte Abnahme zum Herbst hin. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Hildebrand et al. (2003). Allerdings konnte zu allen Zeiten eine höhere Infektion der Adulten nachgewiesen werden, was auf die zweimalige Blutmahlzeit dieses Entwicklungsstadiums und damit einer erhöhten Infektionswahrscheinlichkeit zurückzuführen ist. Erstaunlich hoch war der Anteil von *B. burgdorferi* sensu stricto im Untersuchungsgebiet. Mit 40% war es die dominante Genospezies, gefolgt von *B. afzelii* mit 23,3%. *B. garinii* war mit 5% im Vergleich zu den anderen Jahren sehr selten. Entsprechende Studien im selben Gebiet und anderen Habitaten in Deutschland zeigen *B. burgdorferi* sensu stricto als sehr seltene Genospezies (Rauter et al., 2002; Kurtenbach et al., 2001; Lottmann et al., 1996; Hildebrandt et al., 2003; Fingerle et al., 2004; Franke, 2005). Vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Genospeziesverteilung fanden sich auch in mehreren Studien in Europa (Rauter und Hartung, 2005). Bei Betrachtung des saisonalen Verlaufes der Genospezieshäufigkeit zeigte sich, dass die Prävalenz von *B. burgdorferi* sensu stricto im Frühjahr mit 70,7% signifikant höher war als im Herbst mit 28%. *B. valaisiana* zeigte einen gegensätzlichen Trend von 0% im Frühjahr bis 48% zum Herbst hin. Dieser Trend zeigte sich auch bei der Untersuchung der Kulturen aus Bad Berka und der Zecken von 2004. Allerdings war der Anteil an *B. burgdorferi* sensu stricto hier nicht so hoch. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei Jenkins et al. (2001), wo mit *B. burgdorferi* sensu stricto infizierte Zecken nur im Frühjahr gefunden wurden. *B. burgdorferi* sensu stricto zeigt als Generalist eine partielle Resistenz gegenüber dem Komplement von Kleinsäugetern und Vögeln (Kurtenbach et al., 1998a). Die Häufung im Frühjahr deutet auf einen zeitlich begrenzt vorkommenden Reservoirwirt hin, was eine Verbreitung durch Zugvögel vermuten lässt. Diese These wird durch die Studie von Olsen et al. (1995) gestützt, die in Zugvögeln in Südschweden, welche im Frühjahr aus Südwesten ankamen, *B. burgdorferi* sensu stricto fanden, während diese Genospezies bei Vögeln aus Südost und im Herbst aus Richtung Nord nicht nachweisbar war. Eine ähnliche Studie in der Schweiz konnte das Rotkehlchen als Wirt für *B. burgdorferi* sensu stricto charakterisieren (Marie-Angele et al., 2006). In Amerika zeigte sich das Amerikanische Rotkehlchen als Reservoirwirt für *B. burgdorferi* sensu stricto (Ginsberg et al., 2005). Die Tatsache, dass *B. burgdorferi* sensu stricto häufiger in adulten Zecken zu finden war unterstützt diese These, da Nymphen das bevorzugte Stadium an Vögeln sind. Allerdings konnte in von Vögeln abgesammelten Zecken aus Thüringen nicht in einem Fall *B. burgdorferi* sensu stricto nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.4.4.1). Da unsere Studie erst Ende März begann und die Ankunft der Rotkehlchen in Thüringen schon Anfang März aus Richtung

Südwest stattfindet, ist anzunehmen, dass solche sehr frühen Zugvögel nicht erfasst wurden (Staputt, 2006). Einen weiteren Erklärungsansatz bietet die Untersuchung von Fingerle et al. (2007). Sie fanden heraus, dass junges Rehwild ein möglicher Reservoirwirt für *B. burgdorferi* sensu stricto ist. In ausgewachsenen Tieren konnte dagegen nur noch eine sehr geringe Prävalenz festgestellt werden. Da junges Rehwild auch als Wirt für Larven und Nymphen in Frage kommt, ist eine Transmission möglich. Bezüglich des Entwicklungszustandes von *I. ricinus* konnten keine Unterschiede in der Infektion mit *B. burgdorferi* sensu stricto festgestellt werden. Die Zunahme der Prävalenz von *B. valaisiana* im Jahresverlauf lässt sich möglicherweise mit einer Überwinterung im Reservoir und einer erst im Frühjahr beginnenden Übertragung auf den Vektor erklären. Diese Genospezies konnte hauptsächlich in Adulten nachgewiesen werden, was zeigt, dass vorwiegend Nymphen am infizierten Wirt saugen. Anhand der Untersuchungen in Bad Berka über mehrere Jahre konnte gezeigt werden, dass die Gesamt-Prävalenz sowie auch die der einzelnen Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. in Abhängigkeit von den einzelnen Jahren und der Jahreszeiten sehr variieren können.

5.3 Korrelation von Patientendaten mit den Durchseuchungsraten von *Ixodes ricinus* in freilandgefangenen und vom Menschen abgesammelten Zecken

In den Jahren 2003 und 2004 konnten vom Gesundheitsamt Erfurt 239 und 263 Fälle an Lyme Borreliose für Thüringen registriert werden. Da es sich in Thüringen um eine freiwillige Meldepflicht handelt, können hier nur Tendenzen aufgezeigt werden. Bei der Auswertung der Erkrankungsfälle konnten die höchsten Inzidenzen pro 1000000 Einwohner in den Landreisen Greiz mit 55,6, Saalfeld-Rudolstadt mit 55,1, Jena mit 45,0 und Saale-Orla mit 44,6 gefunden werden. Diese Inzidenzen liegen im Mittelfeld der für Europa ermittelten Werte (O'Connell et al., 1998; Stanek et al., 1993). Innerhalb dieser Kreise wurde eine Vielzahl von Habitaten vorgefunden, die günstige Zeckenbiotope darstellten. Um eine mögliche Korrelation zwischen Prävalenzdaten und registrierten Lyme Borreliose-Fällen zu untersuchen, wurden die gemeldeten Fälle den verschiedenen Pools der Prävalenzbestimmung in Thüringen zugeordnet (siehe Abb. 4.34, S. 78). Dabei konnte eine Korrelation der registrierten Fälle mit der Prävalenz an *B. afzelii* beobachtet werden, nicht aber mit der Gesamtprävalenz von *B. burgdorferi* s. l. in freilandgefangenen Zecken. Daten der gemeldeten Erkrankungsfälle in Thüringen zeigen, dass sich 92,5% als Erythema migrans manifestierten (Gesundheitsamt Erfurt). Eine Dominanz dieses Erscheinungsbildes konnte auch für große Teile Europas gefunden werden (Mehnert & Krause, 2005; Priem et al., 2003; Maiwald et al., 1998; Carlson et al., 2003). Höhere Anteile an neurologischen Erkrankungen zeigten sich in Kroatien mit 32% und in Portugal mit 37% (Golubic et al., 1998; Mulic et al., 2006). Anhand zahlreicher Studien konnte gezeigt werden, dass das Erythema migrans hauptsächlich mit der Genospezies *B. afzelii* assoziiert ist, was die Korrelation der Prävalenzraten dieser Genospezies mit den Krankheitsfällen der einzelnen

Pools in Thüringen erklärt (Assous et al., 1993; Balmeli et al., 1995; Carlson et al., 2003; Logar et al., 2004; van Dam et al., 1993; Wilske et al., 1996b; Ruzic-Sabljic et al., 2000; Bennet et al., 2006). Einzige Ausnahme ist das Saale-Ilmtal, wo eine sehr hohe Erkrankungsrate nicht mit der im mittleren Bereich liegenden Prävalenz in den freilandgefangenen Zecken korreliert. Leider sind die Spätmanifestationen bei der freiwilligen Meldepflicht nicht einbezogen, so dass Aussagen zu Übereinstimmungen wie z. B. von Lyme Arthritis mit dem Vorkommen von *B. burgdorferi* sensu stricto nicht getroffen werden können. Nicht vergessen werden darf, dass in vielen Fällen nach einem Erythema migrans sekundäre Manifestationen auftreten können, welche auch durch *B. afzelii* hervorgerufen werden. So konnten 28% der CFS-Isolate von Patienten mit einer Neuroborreliose als *B. afzelii* charakterisiert werden (Busch et al., 1996). Auch bei Patienten mit Lyme Arthritis wurde *B. afzelii* gefunden (Eiffert et al., 1998).

In Übereinstimmung mit den Erkrankungsfällen stehen auch die Ergebnisse an vom Menschen abgesammelten Zecken. Es konnten 622 *I. ricinus* Zecken (29 Larven, 444 Nymphen, 145 Weibchen und 4 Männchen) in die Untersuchung einbezogen werden. Ähnliche Studien fanden ebenfalls die Nymphe als häufigstes Stadium am Menschen (Dorn et al., 2002; Hubalek et al., 2003; Maiwald et al., 1998; Robertson et al., 2000). In den Landkreisen Jena, Saale-Holzland und Altenburger-Land wurde der überwiegende Teil der Zecken (68,9%-82,9) im Frühjahr entfernt, während es in Suhl und im Saale-Orla-Kreis mit 54% nur etwa die Hälfte im Frühjahr war und die andere Hälfte im Sommer abgesammelt wurde. Dies könnte an den klimatischen Bedingungen im Thüringer Wald und Thüringer Schiefergebirge liegen, die eine Verschiebung der Aktivitäten von Zecken und Mensch in den Sommer hinein verursachen. Im Herbst wurden nur sehr vereinzelt Zecken abgesammelt. Dabei dominierten Weibchen, was an dem meist trockenen Klima im Spätsommer liegt, welches ungünstige Bedingungen für Nymphen bietet. Adulte Zecken sind toleranter gegenüber Trockenheit. Die niedrigen Durchseuchungsraten der vom Menschen abgesammelten Zecken von 4,5% bei den Nymphen und 11,7% bei den Weibchen stehen im Gegensatz zu den von uns gefundenen Prävalenzdaten für freilandgefangene Zecken in Thüringen. Allerdings fand diese Zeckenstudie im Jahr 2002 statt. Eine Prävalenzuntersuchung in Bad Berka im Jahr 2004 ergab wesentlich geringere Werte als in den anderen Jahren. Geht man von allgemein niedrigeren Prävalenzen im Jahr 2004 aus, könnte dies die geringe Durchseuchung der vom Menschen abgesammelten Zecken desselben Jahres erklären. Eine Weitere Erklärung ist die Vernichtung serumsensitiver Stränge während des Saugaktes in der Zecke. Höhere Werte mit 15,1% konnten in den Jahren 1998-2000 von Menschenzecken aus Jena und Umgebung ermittelt werden (Dorn et al., 2002). Eine Gesamtprävalenz von 15,9% fanden Maiwald et al. (1998) und 14% Schaarschmidt et al. (2001) in Patientenzecken aus Süddeutschland. In der Tschechischen Republik waren 20% der von Patienten abgesammelten Weibchen und 9% der Nymphen infiziert (Hubalek et al., 2003). Maiwald et al. (1998) konnten außerdem zeigen, dass 22,6% der Patienten nach dem Stich einer positiven Zecke Symptome der Lyme Borreliose aufwiesen. Aufgrund dieser Ergebnisse

kann man in Gebieten mit einer Infektionsrate von 25% davon ausgehen, dass der Stich jeder 6. Zecke zu einer Infektion führen kann. Hierbei ist Voraussetzung, dass die Zecken lange genug saugen können. Die Bedeutung der Larven bei der Infektion des Menschen ist aufgrund der niedrigen Infektionsrate sehr gering. Bei den Nymphen und Weibchen konnte ein annähernd gleiches Risiko für eine Infektion nachgewiesen werden. Es wurden zwar wesentlich mehr Nymphen abgesammelt als Weibchen, aber diese zeigten auch eine deutlich geringere Infektion. So waren unter den positiven vom Menschen abgesammelten Zecken eine Larve, 20 Nymphen und 17 Weibchen. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Stadien eine wesentliche Rolle bei der Gefährdung des Menschen spielen. Man kann aber annehmen, dass aufgrund der geringen Größe der Nymphe diese häufiger übersehen und damit öfters zu einer Infektion führen können. Nicht geklärt ist, inwieweit die von Wang et al. (2003) bestimmte unterschiedliche Borrelienzahl von durchschnittlich 2000 Zellen/Nymphen und 5300/Adulten, einen Einfluss auf eine tatsächliche Infektion hat. Allerdings zeigten mehrere Studien einen Anstieg der Borrelienzahl beim Saugakt auf mehrere 10000 Zellen pro Zecke (Hodzic et al., 2002; Rathinavelu et al., 2003; Wang et al., 2003).

Erstmals bei der Untersuchung von Patientenzecken in Thüringen konnten die Genospezies und zusätzlich der OspA-Serotyp bestimmt und mit der Verteilung in freilandgefangenen Zecken verglichen werden (Tab. 5.1). Die häufigste Genospezies mit 66% war *B. afzelii*, gefolgt von *B. valaisiana* und *B. garinii* mit 15% und 16%. Vergleicht man die Ergebnisse der Patientenzecken des Saale-Ilmtals (dem Hauptanteil der abgesammelten Zecken) mit denen der freilandgefangenen Zecken aus diesem Gebiet, sind Unterschiede in der Verteilung der Genospezies zu erkennen. In Patientenzecken war *B. afzelii* mit 66% häufiger zu finden als in den freilandgefangenen Zecken mit 34%.

Tab. 5.1 Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. in freilandgefangenen Zecken und vom Menschen abgesammelten Zecken in der Region Saale-Ilmtal

| Genospezies | Freilandgefangenen Zecken | Vom Menschen abgesammelte Zecken |
|----------------------|---------------------------|----------------------------------|
| <i>B. afzelii</i> | 34% | 66% |
| <i>B. garinii</i> | 30% | 15% |
| <i>B. valaisiana</i> | 24% | 16% |

Unsere Ergebnisse stützen damit die Theorie der unterschiedlichen Abwehrreaktion des menschlichen Serums gegen die verschiedenen Genospezies von *B. burgdorferi* s. l. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die drei humanpathogenen Arten unterschiedlich auf das menschliche Serum reagieren. Wachstumsversuche zeigten, dass es serumsensitive (viele *B. garinii*-Stämme), teilweise serumsensitive (*B. burgdorferi* sensu stricto) und serumresistente Stämme gibt, zu denen fast alle untersuchten *B. afzelii* Stämme gehörten (van Dam et al., 1997; Breitner-Ruddock et al., 1997; Kraiczy et al., 2000; Kraiczy et al., 2001b; Kraiczy et al., 2006).

Diese unterschiedliche Reaktion auf das menschliche Serum spiegelt sich in der Genospeziesverteilung der Patientenzecken wieder und erklärt den hohen *B. afzelii*-Anteil. Die von uns bestimmten *B. garinii*-Zecken setzten sich zusammen aus Serotyp 4 (1x), Serotyp 5 (2x) und Serotyp 6 (2x).

5.4 Untersuchungen zur Durchseuchung der Kleinsäuger mit *Borrelia burgdorferi* s. l.

Viele Untersuchungen in Deutschland und Europa weisen auf eine bedeutende Rolle der Kleinsäuger bei der Verbreitung von *B. burgdorferi* hin. Wie in anderen Studien in Europa sind auch in Bad Berka die Gelbhalsmaus (*A. flavicollis*) und die Rötelmaus (*M. glareolus*) die am häufigsten vorkommenden Kleinsäuger (Kurtenbach et al., 1998b; Hanincova et al., 2003, Pawelczyk et al., 2004, Michalik et al., 2003). Da die Mäuse in Bad Berka, einem typischem Zeckenbiotop, gefangen wurden, kann von einer hohen Exposition der Tiere gegenüber *I. ricinus* Zecken ausgegangen werden.

Die Infestationsraten mit *I. ricinus* waren in den einbezogen Jahren großen Schwankungen unterworfen (Abb. 5.3). Auch die Ergebnisse einer früheren Untersuchung zeigten diese Unterschiede zwischen den Jahren (Sünder, 2003). Zu erklären sind sie mit Schwankungen in der *I. ricinus* Dichte und sind damit zurückzuführen auf klimatische Unterschiede und das Vorkommen von Wirtspopulationen. Neben den Unterschieden in den einzelnen Jahren unterscheiden sich die Infestationsraten auch saisonal. So konnte 2002 und 2004 eine deutliche Abnahme zum Herbst hin verzeichnet werden.

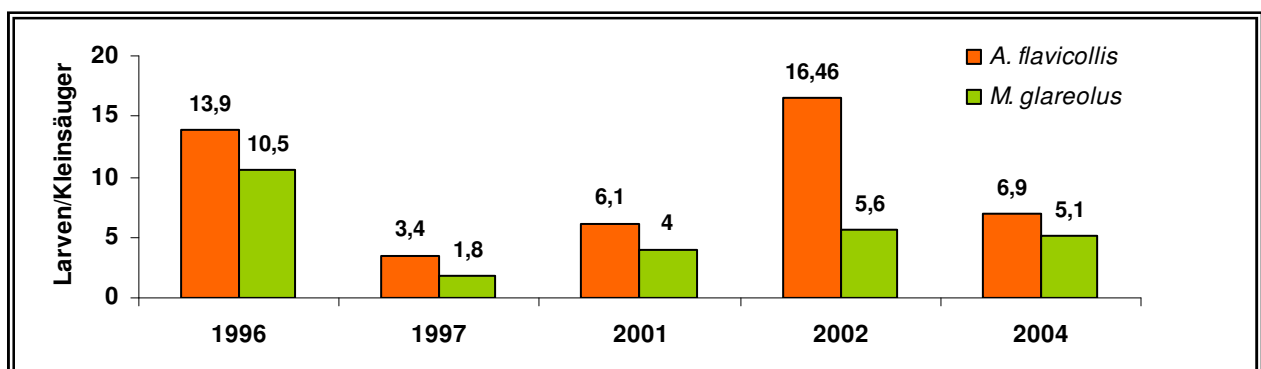


Abb. 5.3 Infestationsraten der Kleinsäuger in den unterschiedlichen Jahren (Ergebnisse der Jahre 1996/97 aus Sünder, 2003)

Man kann hier von einem unimodalen Aktivitätsverlauf der Zecken mit einem Maximum im Frühjahr ausgehen. Diesen fanden auch Eisen et al. (2002); Gray et al. (1998) und Tälleklint und Jaenson (1996). 2001 konnte nach der Abnahme im Sommer zum Herbst hin ein leichter Anstieg verzeichnet werden, was auf einen bimodalen Aktivitätsverlauf hindeutet, der vermutlich klimatisch bedingt ist.

Auch zeigten sich artenabhängige Infestationsunterschiede. So konnten wie auch bei Gray et al. (1999), Kurtenbach et al. (1995), Pawelczyk et al. (2004) und Sinski et al., (2006) bei *A. flavicollis* die höheren Infestationsraten festgestellt werden. Die Erklärung der höheren Infestation liegt in einer nach mehreren Zeckenbissen erworbenen Resistenz gegenüber Zecken, wobei es zur Bildung von Antikörpern gegen Antigene der Zecken kommt. Das Ergebnis ist ein verschlechterter Häutungserfolg aber auch eine verminderte Infestation (Dizij und Kurtenbach, 1995; Humair et al., 1999; Lawrie und Nutall, 2001). Im Vergleich zur Infestation mit Larven ist die Infestation mit Nymphen bei beiden Arten sehr gering, diese ist aber den gleichen Schwankungen unterworfen.

Die Untersuchung der gesogenen Zecken und der Biopsieproben fand ebenfalls mittels PCR-RFLP des *OspA*-Gens statt. Für die freilandgefangenen Zecken wurde zur Extraktion der DNeasy Tissue Kit benutzt, ein in vielen Studien angewandter Kit (Bigl et al., 1999; Derdakova et al., 2003; Hodzic et al., 2002; Rauter et al., 2002). Es ist aber bekannt, dass einige Substanzen im Blut, wie das Hämoglobin und Heparin oder Zellbestandteile die PCR negativ beeinflussen können (Schwartz et al., 1997; Sparagano et al., 1999). Aus diesem Grund eignen sich Isolationsmethoden, die in der Lage sind, diese Stoffe zu eliminieren. Vor der Verwendung der gesogenen Zecken wurden nun verschiedene Extraktionsmethoden in Verbindung mit Blut und Zeckenbestandteilen getestet. Dabei zeigte der SIGMA GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit die besten Ergebnisse mit einer Nachweisgrenze von zehn Borrelien und wurde für die gesogenen Zecken von Kleinsäufern und Vögeln und die Biopsieproben verwendet. In der Literatur existieren bisher keine Ergebnisse zur Verwendung dieses Kits.

Die gefundene Infektionsrate in von Kleinsäufern abgesammelten Zecken war mit 2,9% sehr gering, was auf die ebenfalls sehr niedrigen Prävalenzen der freilandgefangenen Zecken und den geringen Befall der Mäuse mit Nymphen zurückzuführen ist. Die Höhe der Durchseuchung der Kleinsäuger ist abhängig von infestierten positiven Nymphen (Tälleklint und Jaenson, 1994). Ähnlich geringe Werte fand auch Humair et al. (1999) in der Schweiz und Pawelczyk et al. (2004) in Polen. Allerdings waren in der Schweiz die Werte für von *M. glareolus* abgesammelte Larven deutlich höher. In unserer Untersuchung wurden ebenfalls mehr positive Larven an *M. glareolus* gefunden. Insgesamt war der Anteil der Kleinsäuger mit positiven Larven deutlich höher als bei *A. flavicollis*, was auf eine höhere Durchseuchung und Transmission von *B. burgdorferi* hindeutet. Diesen Trend bestätigen auch Humair et al., 1999; Kurtenbach et al. (1994), Michalik et al. (2003) und (2005) wo jeweils an *M. glareolus* der größere Anteil an positiven Zecken gefunden wurde. Eine Erklärung für diese unterschiedlichen Transmissionsraten liegt in einer geringeren Immunität die *M. glareolus* gegenüber *B. burgdorferi* s. l. entwickelt und somit höhere Infektions- und Transmissionsraten verursacht, was mehreren Studien belegen (Humair et al., 1999, Kurtenbach et al., 1994). So konnte nachgewiesen werden, dass die Immunantwort negativ mit der Infektiösität korreliert (Kurtenbach et al., 1994; Kurtenbach et al., 2002, Straubinger et al., 2000). *A. flavicollis* kann sich laut dieser Studien durch eine bessere

Immunantwort effizienter gegen die eingedrungenen Spirochäten wehren, wobei dem Komplement eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (De Silva et al., 1999; Kurtenbach et al., 1998; Wallich et al., 2005). Betrachtet man die in dieser Studie durchgeführten immunologischen Untersuchungen der Blutproben, konnten keine Unterschiede in der Prävalenz der Antikörper gefunden werden. Auch in den Durchschnittswerten der Titerstufen seropositiver Kleinsäuger unterschieden sich die beiden Kleinsäugerarten nicht deutlich voneinander. Nach der vorausgegangenen Theorie wäre zu erwarten gewesen, dass, aufgrund der stärkeren Immunantwort, die Titer bei *A. flavicollis* höher wären als bei *M. glareolus*. Diese höheren Titer der *B. burgdorferi* s. l. Antikörper und damit eine Bestätigung der Theorie fanden Frandsen et al. (1995), Kurtenbach et al. (1994) und Pawelczyk et al. (2000). Ähnliche Verhältnisse wie bei uns fanden sich bei Vostal und Januska (2003).

Beim Vergleich der Anzahl seropositiver Tiere 2001 konnten keine Unterschiede in der Prävalenz der positiven Tiere der beiden Arten beobachtet werden. Im Jahr 2002 zeigten sich dagegen mehr positive *A. flavicollis* und im Jahr 2004 mehr positive *M. glareolus*. Beim Vergleich der saisonalen Prävalenzen seropositiver *M. glareolus* mit der Infestation mit Nymphen wurden deutliche Abhängigkeiten voneinander festgestellt (Abb. 5.4). So sank aufgrund fehlender Infestation mit Nymphen und der Verjüngung der Population im Jahr 2001 die Anzahl seropositiver Tiere vom Frühjahr zum Herbst bis auf null im Frühjahr 2002. Auf eine sehr hohe Infestation mit potentiell positiven Nymphen im Frühjahr 2002 folgte dann ein starker Anstieg der seropositiven Tiere im Sommer, die zum Herbst wieder abnahm, weil die Infestation mit Nymphen im Sommer sehr gering war.

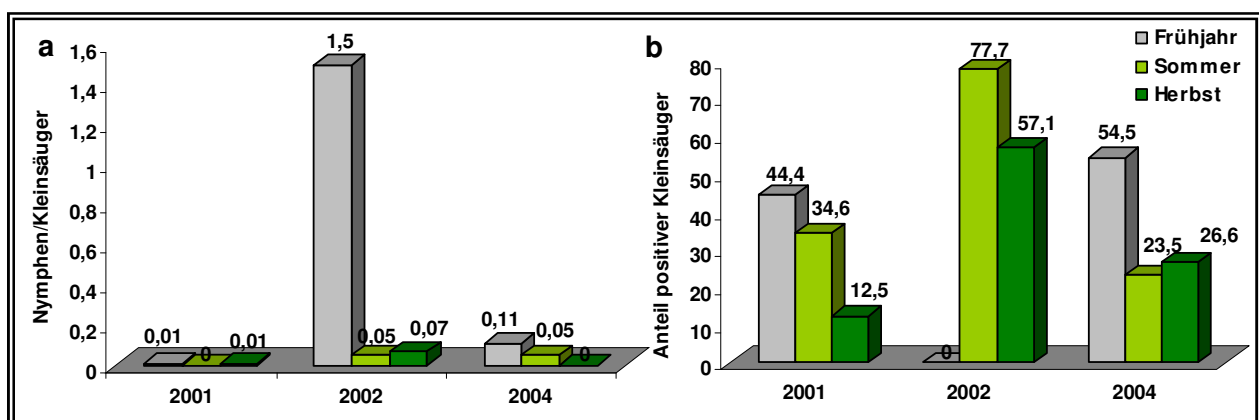


Abb. 5.4 Zusammenhang zwischen a) Infestation mit Nymphen und b) Prävalenz der positiven Titer bei *M. glareolus* in den Jahren 2001, 2002 und 2004.

Auch für 2004 konnte dieser Zusammenhang nachgewiesen werden und bestätigt die schon bei Tälleklint und Jaenson (1994) beschriebene Bedeutung der Infestation mit Nymphen für eine Durchseuchung der Kleinsäuger. Eine Diskussion der gefundenen Genospezies ist aufgrund der geringen Menge nicht möglich. Die gefundenen Genospezies *B. afzelii* und *B. burgdorferi* sensu stricto wurden in anderen Studien hauptsächlich in Kleinsäufern oder abgesammelten

Larven gefunden (Humair et al., 1998; Khanakah et al., 2006; Kurtenbach et al., 1998b; Kiessling et al., 2007). Aber auch *B. garinii* konnte nachgewiesen werden (Khanakah et al., 2006; Kurtenbach et al., 1998b; Pawelczyk et al., 2004). Hier kann man annehmen, dass es sich um *B. garinii* OspA-Serotyp 4 handelt, für den Kleinsäuger Reservoir sind (Hu et al., 2001; Huegli et al., 2002). Als häufigste Mischinfektion in freilandgefangenen Zecken in Süddeutschland wurden *B. burgdorferi* sensu stricto mit *B. garinii* OspA-Serotyp 4 ermittelt, was auf eine gemeinsame Übertragung durch Kleinsäuger hindeutet. Hovius et al. (2007) wiesen nach, dass es bei einer gemeinsamen Übertragung dieser beiden Genospezies zu mehr Fällen von Lyme-Arthritis kommt als bei einer isolierten Übertragung von *B. burgdorferi* sensu stricto. Insgesamt hat sich gezeigt, dass die Reservoirrolle der Kleinsäuger und damit das Vorkommen von Kleintier-assoziierten Genospezies von vielen Faktoren abhängig ist. Je nach saisonalen und regional-ökologischen Gesichtspunkten kann eine Wirtstierpopulation unterschiedlich kompetent als Reservoir sein (de Boer et al., 1993; Matuschka et al. 1992; Tälleklint et al., 1993).

5.5 Untersuchungen zur Durchseuchung der Vögel mit *Borrelia burgdorferi* s. l.

Eine bedeutende Rolle der Vögel für die Verbreitung von *B. burgdorferi* s. l. konnte schon in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden. Dabei stellen die Häufigkeit und ihre große Mobilität bedeutende Faktoren dar. Aufgrund der großen Entfernung, die Zugvögel zurücklegen können, kann der Erreger über weite Teile der Erde transportiert werden (Ginsberg et al., 2005; Olsen et al., 1995; Haninkova et al., 2003; Kaiser et al., 2002; Marie-Angele et al., 2006). Ungeklärt ist jedoch noch weitgehend in welchem Maße die verschiedenen Vogelarten in Thüringen an der Verbreitung der verschiedenen Genospezies und vor allem der OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. beteiligt sind. Zur Klärung der Rolle als Reservoir wurden die Infestationsraten aller gefangenen Vögel bestimmt und die gesogenen Zecken untersucht.

Im Rahmen des Singvogelmonitorings konnten in den drei Gebieten in zwei Jahren insgesamt 2303 Vögel gefangen werden, von denen 194 Larven und 721 Nymphen abgesammelt wurden. Ähnliche Studien zeigten ebenfalls die Nymphen als dominantes Stadium an Vögeln (Haninkova et al., 2004; Spitalska et al., 2006). Allerdings kann die Zahl der Larven etwas höher liegen, da eventuell im Gefieder sitzende Larven leicht zu übersehen sind. Die Infestationsraten der Vogelarten variierten sehr stark, die höchsten fanden sich bei Amseln (*Turdus merula*) (75,9%) und Singdrosseln (*Turdus philomelos*) (50,6%). Dabei zeigte sich ein Peak der Infestation der Nymphen im Mai und der Larven im Juni. Im Juli und August konnten nur sehr selten Larven abgesammelt werden, was zum einen mit dem Lebenszyklus und zum anderen mit der eingeschränkten Aktivität bei hohen Temperaturen und geringer Luftfeuchte in diesen Monaten erklärt werden kann. Bei baumlebenden Arten wurden wie zu erwarten kaum Zecken gefunden. Allerdings waren auch einige bodenlebende Vogelarten nur wenig befallen. Ein

Beispiel hierfür ist die Heckenbraunelle (*Prunela modularis*). Dieser häufig gefangene Vogel zeigte mit 10,1% eine sehr geringe Infestation, wobei viele Zecken tot abgelesen wurden. Diese Tatsache spricht für eine, auch bei Kleinsäugetieren gefundenen, Resistenz gegenüber Zecken (Dizij und Kurtenbach, 1995; Humair et al., 1999), was in dieser Studie erstmals für Vögel dokumentiert wurde. Weitere Untersuchungen hierzu sind noch nötig.

Positive Zecken (119/651) konnten von acht Spezies abgesammelt werden. Die Gesamtprävalenzen von *B. burgdorferi* s. l. in den abgesammelten Larven und Nymphen lagen bei 20,7% bzw. 19,3%. Aufgrund der zusätzlichen Blutmahlzeit der Nymphen im Gegensatz zu den Larven, wäre eine höhere Prävalenz der Nymphen zu erwarten gewesen. Wirte von Larven sind hauptsächlich Kleinsäugetiere, die die Larven mit *B. afzelii* und *B. burgdorferi* sensu stricto infizieren können (Humair et al., 1998; Kurtenbach et al., 1998). Diese erworbene *B. afzelii* Infektion wird jedoch beim Saugen am Vogel durch dessen Komplement vernichtet (Kurtenbach et al., 1998b; Kurtenbach et al., 2002). *B. burgdorferi* sensu stricto konnte in den vorliegenden Untersuchungen in Vogelzecken nicht nachgewiesen werden. Die höchsten Prävalenzen unserer Untersuchung zeigten Amseln und Singdrosseln. Die an diesen beiden Arten saugenden *I. ricinus* Zecken waren zu 31,4% und 12,7% infiziert und stimmen damit mit Ergebnissen aus der Slowakei überein, wo 28% der von Amseln und Singdrosseln abgesammelten Zecken positiv waren (Haninkova et al., 2003). Eine ähnliche Studie in Polen, bei der Amseln und Singdrosseln eine Infestationsrate von 98% zeigten, konnte dagegen nur eine *B. burgdorferi* s. l. Prävalenz von 8,6% nachweisen. Spitalska et al. (2006) fanden dagegen in der Slowakei weder positive Larven noch Nymphen an diesen beiden Arten. Blutuntersuchungen von Vögeln in Polen zeigten eine hohe Durchseuchung mit *B. burgdorferi* s. l. beim Baumpieper (*Anthus trivialis*) mit 21% und bei der Heckenbraunelle mit 16%, die in unserer Untersuchung nur sehr geringe Infestationsraten und keine positiven Zecken zeigten. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen waren nur 4% der Blutproben von Amseln positiv (Gryczynska et al., 2004). Es gab keine Bestätigung für eine Reserviertierrolle von Nachtigall (*Luscinia megarhynchos*), Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*) und Zilpzalp (*Phylloscopus collybita*) in unserem Untersuchungsgebiet, wie bei Kaiser et al. (2002) für Süddeutschland berichtet. Auch in einer Studie in der Schweiz wurde das Rotkehlchen als Reservoir beschrieben. Hier waren 8,4% der Rotkehlchen mit positiven Zecken infiziert, die hauptsächlich *B. burgdorferi* sensu stricto enthielten (Marie-Angele et al., 2006). In dieser Studie wurde auch nachgewiesen, dass Vögel Reservoir für *B. lusitanae* sind. Die Wacholderdrossel (*Turdus pilaris*), welche hohe Infestations- und Infektionsraten der Zecken zeigte, konnte in der vorliegenden Arbeit nur in geringer Anzahl gefangen werden. Man kann vermuten, dass sie in Gebieten, wo die Abundanz höher ist, eine bedeutende Rolle als Reservoir spielt. Die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien verschiedener Regionen Mitteleuropas lassen den Schluss zu, dass in verschiedenen Gegenden unterschiedliche Vogelarten als Reservoir für *B. burgdorferi* s. l. agieren.

Von 45,5% der Amseln und 21,4% der Singdrosseln konnten positive Larven und/oder mehrere positive Nymphen abgesammelt werden. In diesem Fall kann von einer Infektion und Übertragung des Erregers vom Vogel ausgegangen werden. Gestützt wird diese Annahme von der Tatsache, dass bei dem Vorhandensein mehrerer positiver Zecken an einem Vogel dieselbe Genospezies nachgewiesen wurde. Geht man davon aus, dass die Hälfte der Amseln und ein Viertel der Singdrosseln infiziert sind, kann man von einer bedeutenden Rolle dieser Arten bei der Verbreitung von *B. burgdorferi* s. l. in Thüringen ausgehen. Da allerdings keine Blutuntersuchungen stattgefunden haben, können keine genauen Angaben zu Infektionen bei den Vögeln getroffen werden. Man kann aber annehmen, dass die Durchseuchungsrate noch höher liegt, da auch viele Vögel ohne Zecken oder mit nur leicht gesogenen Zecken gefangen und als nicht infiziert betrachtet wurden. Wie bei der Infestation konnten auch in der Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. Unterschiede in den einzelnen Gebieten gefunden werden. Die in Reifenstein gefundene höhere Gesamtprävalenz der Zecken aller Vögel lässt sich mit den hohen Fangzahlen an Amseln und Singdrosseln erklären, was die große Bedeutung der Abundanz eines Reserviertieres bei der Verbreitung von *B. burgdorferi* s. l. unterstreicht. Vergleicht man die Infestation/Infektion der Amseln der unterschiedlichen Gebiete, so konnten in Hütscherode die höchsten Infestations- und auch die höchsten Durchseuchungsraten bestimmt werden. Die höheren Durchseuchungsraten können mit der höheren Dichte an Zecken in diesem Gebiet erklärt werden, da so die Wahrscheinlichkeit für einen Wirt steigt, von einer positiven Zecke befallen und infiziert zu werden. Abbildung 4.27 (S. 73) zeigt diese Korrelation zwischen der Infestation mit *I. ricinus* und der Prävalenz an *B. burgdorferi* s. l. bei Amseln auch für die anderen Gebiete. Betrachtet man die saisonale Prävalenz der abgesammelten Nymphen kann eine Zunahme zum Sommer hin festgestellt werden. Dieser Anstieg lässt sich mit einer zunehmenden Durchseuchung der Vögel insbesondere der Jungtiere im Jahresverlauf erklären. Diese Erhöhung der Prävalenz der vogelassoziierten Genospezies *B. garinii* und *B. valaisiana* spiegelte sich auch in den freilandgefangenen Zecken in Bad Berka wieder (Abb. 4.8, S.56).

Die Bestimmung der 656 gesogenen Zecken mittels PCR-RFLP des *OspA*-Gens ergab eine Infektion mit *B. valaisiana* in 24,6% und eine Infektion mit *B. garinii* *OspA* Serotyp 6 als häufigstem Serotyp in 57,7% der positiven Zecken. 9,9% der Zecken waren infiziert mit *B. garinii* *OspA*-Serotyp 5. Die *OspA*-Serotypen 3 und 7 waren mit 1,4% und 0,7% selten. Eine ähnliche Verteilung der Genospezies in Vogelzecken fanden auch Mannelli et al. (2005) mit 76,2% *B. garinii* und 23,8% *B. valaisiana*. Mit 54,5% war der *OspA*-Serotyp 3 bei Untersuchungen in der Slowakei der häufigste Serotyp, was auf eine andere Zusammensetzung der Vogelpopulationen schließen lässt, wozu keine Angaben gemacht werden können. Serotyp 6 kam hier mit 9,1% am seltensten vor (Hanincova et al., 2003). Untersuchungen in England konnten den Fasan als Reservoir für den Serotyp 3 (Kurtenbach et al., 1998c; Kurtenbach et al., 2002a) identifizieren. Im Gegensatz zur Prävalenz von *B. afzelii* in

freilandgefangenen Zecken, konnte unter den Vogelzecken nur eine Zecke (0,7%) mit dieser Genospezies infiziert gefunden werden. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Untersuchungen, die zeigen, dass Vögel diese Genospezies nicht übertragen (Hanincova et al., 2003; Humair et al., 1998; Kurtenbach et al., 1998b; Kurtenbach et al., 2002a, c). Das PCR-Produkt von sieben Zecken zeigte eine atypische Bande bei ca. 350bp, welche nach Sequenzierung und Vergleich mit der Gen-Bank die größte Übereinstimmung mit *B. valaisiana* zeigten. Möglich ist die Existenz eines *B. valaisiana*-Typs, der andere RFLP-Schnittstellen der benutzten Enzyme besitzt.

Vergleicht man die Genospezies der von Amseln und Singdrosseln abgesammelten Zecken, können nur Unterschiede bezüglich der *B. garinii* OspA-Serotypen gefunden werden (Abb.4.31, S. 76). In Singdrosseln wurden die OspA-Serotypen 3,6,7 und Typ Ba52 gefunden. Nicht bestimmt werden konnte hier Serotyp 5, der aber in Amseln häufig war. Die Serotypen 3 und 7 fehlten hier. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die einzelnen Vogelarten unterschiedlich kompetent als Reservoir für die verschiedenen OspA-Serotypen sind.

Mischinfektionen konnten in 21,3% der positiven Zecken gefunden werden. Diese waren am häufigsten ein Mix von *B. valaisiana* und *B. valaisiana* TypII oder von *B. garinii* OspA-Serotyp 5 und Serotyp 6. Diese Kombination konnte auch sehr häufig in Isolaten und freilandgefangenen Zecken aus Thüringen bestimmt werden und bestätigt die Vermutung, dass der Serotyp 5 bevorzugt mit Serotyp 6 zusammen übertragen wird. Als Einzelinfektion wurde der Serotyp 5 weniger häufig gefunden. Die selten vorkommende Mischinfektion von *B. garinii* mit *B. valaisiana* legt die Vermutung nahe, dass diese beiden nicht gemeinsam übertragen werden und die Doppelinfektionen das Ergebnis von individuellen Infektionen ist. Gestützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass bei Vögeln mit mehreren positiven Zecken derselben Genospezies, als Zeichen für eine Infektion des Vogels, nicht in einem Fall *B. garinii*/*B. valaisiana* als Mischinfektion gefunden wurde. Die vorkommende Prävalenz der Mischung dieser beiden Genospezies in freilandgefangenen Zecken von immerhin 25% zeigt aber, dass diese Genospezies als Ergebnis von individuellen Infektionen zusammen in der Zecke coexistieren können. So können diese Mehrfachinfektionen durch mehrmalige Blutmahlzeiten oder durch Cotransmission, der Übertragung des Erregers von einer Zecke auf die andere beim Saugen am selben Wirt entstehen (Gern und Rais, 1996; Randolph et al., 1996).

Ein Vergleich der Prävalenzen in von Vögeln abgesammelten und freilandgefangenen Zecken in Reifenstein zeigt die Bedeutung der Vögel als Reservoir für bestimmte Genospezies (Abb. 5.5). In freilandgefangenen Nymphen waren die Genospezies *B. afzelii* und *B. valaisiana* mit 4,0% bzw. 5,2% am häufigsten vertreten. Der hohe Anteil von *B. afzelii* zeigt, dass auch Kleinsäuger in diesem Gebiet eine bedeutende Rolle als Reservoir spielen. Der sehr niedrige Anteil von *B. afzelii* in den adulten Zecken (0,6%) lässt sich mit der geringen Infestation der Kleinsäuger mit Nymphen erklären, die wir in unseren Untersuchungen ebenfalls nachgewiesen haben. Man kann davon ausgehen, dass Vögel im Untersuchungsgebiet die Hauptwirte der

Nymphen sind und eine bereits bestehende *B. afzelii* Infektion vernichtet wird. Auch die Metaanalyse von Rauter und Hartung (2005) konnte in der Zusammenfassung der Untersuchung mehrerer europäischer Länder *B. afzelii* in Nymphen häufiger nachweisen als in adulten Zecken. Dass auch in dieser Studie *B. garinii* häufiger in adulten Zecken zu finden war, zeigt die Bedeutung der Vögel als Hauptwirte der Nymphen für weite Teile Europas.

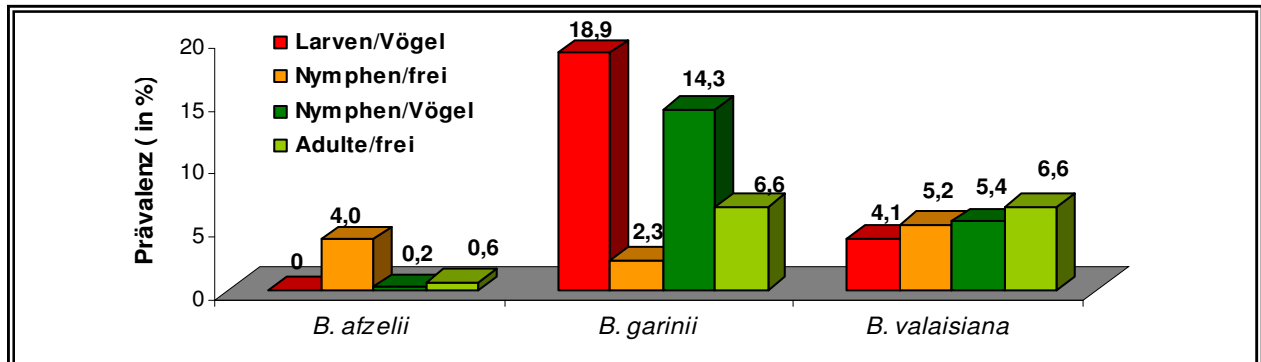


Abb. 5.5 Vergleich der *B. burgdorferi* s. l. -Prävalenz in von Vögeln abgesammelten und freilandgefangenen Zecken

Auffällig ist die hohe Prävalenz von *B. valaisiana* mit 5,2% im Gegensatz zu *B. garinii* mit 2,3% in den freilandgefangenen Nymphen, da die von Vögeln abgesammelten Larven hauptsächlich mit *B. garinii* infiziert waren.

B. valaisiana konnte in gesogenen Larven oder als Mehrfachinfektion von Zecken eines Vogels mit 27% im Vergleich zu *B. garinii* mit 73% deutlich weniger häufig nachgewiesen werden, was die Vermutung nahe legt, dass die Transmission durch die untersuchten Vögel eine nur geringe Rolle spielt. Eine bisher allgemein angenommene Reservoirfunktion der Vögel für *B. garinii* und *B. valaisiana* muss daher differenzierter betrachtet werden. Aus dem hohen Anteil von *B. valaisiana* in den Freilandzecken im Vergleich zu den von Vögeln abgesammelten kann geschlussfolgert werden, dass zusätzlich ein anderes Wirtstier als Reservoir eine Rolle spielen muss. Im Gespräch ist hier der Fuchs (Gern et al., 2005).

Unsere Ergebnisse machen deutlich, in welchem Maße die Zusammensetzung von Reserviertiergruppen in einem Gebiet die Prävalenz an *B. burgdorferi* s. l. und dessen Genospezies und OspA-Serotypen-Verteilung bestimmen. Aussagen zur tatsächlichen Prävalenz in Vögeln können keine getroffen werden, da weder Blut noch Biopsieproben untersucht wurden. Zur genaueren Charakterisierung der immunologischen Aspekte der Vögel als Reserviertier müssten diese untersucht werden, um zu verstehen, wie sie als Reserviertiere funktionieren. Nötig sind Erkenntnisse über Zusammenhänge zwischen einzelnen Wirtstiergruppen und den verschiedenen *Borrelia*-Genospezies und warum diese existieren.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Lyme Borreliose ist in Europa die häufigste durch Zecken übertragene Infektionskrankheit mit geschätzten mehreren zehntausend neuen Fällen pro Jahr. In endemischen Gebieten sind die Erreger der Lyme Borreliose eingebunden in Transmissionszyklen bei denen die Zecken als Vektor und Kleinsäuger sowie Vögel als Reservoir beteiligt sind.

Zur Bestimmung der *B. burgdorferi* s. l. Prävalenz in Thüringen wurden im Sommer 2002 an 50 öffentlich stark genutzten Flächen 1616 *I. ricinus* Zecken gesammelt. Die durchschnittliche Durchseuchung der Nymphen lag bei 10,2% und der adulten Zecken bei 22,9% mit regionalen Schwankungen von jeweils 3,8%-13,3% und 10%-28,4%. In adulten Zecken war die durchschnittliche Infektionsrate signifikant höher als in den Nymphen. Die am häufigsten nachgewiesene Genospezies war *B. afzelii* (33,25) gefolgt von *B. garinii* (29%), *B. valaisiana* (28%) und *B. burgdorferi* sensu stricto (9,8%). In der Prävalenz und der Verbreitung der Genospezies und OspA-Serotypen von *B. burgdorferi* s. l. gab es teilweise erhebliche regionale Unterschiede. Im Norden Thüringens fanden wir hauptsächlich *B. garinii* und *B. valaisiana*, was auf eine bedeutende Rolle der Vögel als Reservoir hinweist. Im Thüringer Wald war *B. afzelii* die dominante Genospezies. Wir nehmen an, dass *Apodemus* und *Myodes* Arten eine wichtige Rolle als Reservoir für *B. burgdorferi* s. l. in dieser Region übernehmen. Unter den *B. garinii* infizierten Zecken detektierten wir hauptsächlich den OspA-Typ 6 (90,3%) gefolgt von OspA Typ 5 (8,1%). Doppelinfektionen wurden in 19 von 225 (8,4%) positiven Zecken nachgewiesen zu gleichen Anteilen in Nymphen und adulten Zecken mit den Mischungen *B. garinii* OspA Typ 6/*B. valaisiana* (21%), *B. garinii* OspA Typ 5/ *B. garinii* OspA Typ 6 (15,8%) und *B. valaisiana*/*B. valaisiana* Typ 2 (15,8%). Das gleichzeitige Vorkommen der von Vögeln übertragenen Genospezies (*B. garinii*, *B. valaisiana*) und solchen, die von Kleinsäufern übertragen werden (*B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto) unterstützen die Hypothese, dass das Komplementsystem des Wirtes Spirochäten innerhalb der Zecke vernichtet.

121 aus Zecken isolierte *B. burgdorferi* s. l. Isolate wurden auf Prävalenz und Vorkommen der *B. burgdorferi* s. l. OspA-Serotypen untersucht. Der größte Teil der Isolate waren Einfachinfektionen (115; 95,8%). Die dominante Genospezies war *B. garinii* (69; 57%) gefolgt von *B. burgdorferi* s. s. (26; 21,5%), *B. valaisiana* (14; 11,6%) und *B. afzelii* (6; 5%). Unter den *B. garinii* Isolaten konnten alle OspA Serotypen (3-7) außer dem OspA Serotyp 4 nachgewiesen werden. Neun der Stämme unterschieden sich in ihrem RFLP Mustern von vorher beschriebenen Ergebnissen. Die Sequenzierung dieser Stämme zeigte, dass alle zur *B. garinii* Gruppe gehörten. Vier dieser Isolate zeigten die größte Übereinstimmung mit Stämmen des OspA-Typ 8. Eine enge Verwandtschaft mit *B. garinii* OspA-Typ 3 konnte bei

fünf Isolaten mit drei verschiedenen RFLP-Mustern gefunden werden. Diese Daten weisen auf eine größere genetische Heterogenität innerhalb der *B. garinii* Gruppe hin als bisher beschrieben.

Von März bis Oktober der Jahre 2004 und 2005 wurden in Reifenstein 2303 Vögel aus 39 Arten gefangen um ihre Rolle als Wirt für *I. ricinus* und als Reservoir für *B. burgdorferi* s. l. zu bestimmen. Insgesamt konnten 915 Zecken von 254 Vögeln mittels PCR-RFLP-Untersuchung auf die Prävalenz von *B. burgdorferi* s. l. untersucht werden. Mehrere kommerzielle Extraktionskits wurden auf ihre Sensitivität beim Nachweis der Spirochäten-DNA aus gesogenen Zecken getestet. Als sensitivster Kit zeigte sich der Sigma GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit. An acht der Vogelarten konnten *B. burgdorferi* s. l. -infizierte Zecken gefunden werden. Die durchschnittliche *B. burgdorferi* s. l. Prävalenz in von Vögeln abgesammelten Zecken betrug 19,4% (Larven: 20,7%, Nymphen: 19,3%). Die durchgeführten Untersuchungen ergaben ein Vorkommen von *B. valaisiana* in 29/119 (23,8%) der Zecken und 82/119 (70,4%) waren infiziert mit *B. garinii* mit Typ 6 als häufigsten OspA-Serotyp. Doppelinfektionen (21,3%) enthielten zwei verschiedenen *B. valaisiana* Typen oder einen Mix aus *B. garinii* OspA-Typ 5/ *B. garinii* OspA-Typ 6 als die häufigsten Varianten. Die Amsel scheint der effizienteste Wirt für *I. ricinus* und das Hauptreservoir für *B. garinii* zu sein. Eine Reservoirrolle der Vögel für *B. valaisiana* konnte nicht nachgewiesen werden.

Im Jahr 2004 wurden insgesamt 618 vom Menschen abgesammelte *I. ricinus* Zecken durch Thüringer Ärzte eingeschickt. Der Nachweis von *B. burgdorferi* s. l. wurde ebenfalls mittels PCR-RFLP des *OspA*-Gens durchgeführt. Die durchschnittliche *B. burgdorferi* s. l. Prävalenz lag bei 6%. *B. afzelii* konnte in 67,5%, *B. valaisiana* in 15% und *B. garinii* in 15% der positiven Zecken gefunden werden. Eine Zecke enthielt eine Doppelinfektion von *B. valaisiana* II mit *B. garinii* OspA-Typ 5. Weibliche Zecken zeigten die höchste Infektionsrate (11,7%) gefolgt von Nymphen (4,5%) und Larven (3,4%). Ein Anstieg der Prävalenz vom Frühjahr (4%) zum Herbst (10%) konnte beobachtet werden. Allerdings wird das Risiko einer Infektion im Sommer aufgrund einer höheren Infestation und der damit höheren absoluten Zahl infizierter Zecken höher eingeschätzt. Die Dominanz von *B. afzelii* lässt sich mit dessen Resistenz gegenüber dem menschlichen Komplement erklären. Die sehr niedrige Gesamtprävalenz dagegen ist das Ergebnis der Abwehrmechanismen gegenüber den weniger resistenten Stämmen von *B. burgdorferi* s. l. innerhalb der Zecke.

SUMMARY

In Europe Lyme borreliosis is the most prevalent tick borne disease with several thousand cases estimated to occur each year. In endemic areas Lyme borreliosis spirochetes are integrated in transmission cycles involving the vector tick and small mammals and birds that act as reservoir.

To determine the prevalence of *B. burgdorferi* in Thuringia, 1616 *I. ricinus* ticks (972 nymphs, 419 females and 225 males) have been collected during the summer of 2002 from 50 public-use recreation areas. The mean infection rate in nymphs was 10.2% and in adult ticks 22.9% with a regional range from 3.8% to 13.3% and 10.0% to 28.4% respectively; the overall mean was 13.9%. The mean infection rate was significantly higher in adults than in nymphs. The genospecies most frequently identified was *B. afzelii* (33.2%), followed by *B. garinii* (29%), *B. valaisiana* (28%) and *B. burgdorferi sensu stricto* (9.8%). There are partially considerable geographic variations in the infection prevalence and distribution of *B. burgdorferi* s. l. genospecies. In the north of Thuringia we found primarily *B. garinii* and *B. valaisiana* suggesting a major role of birds as reservoirs. In the Thuringian Forest *B. afzelii* was the predominant species. We assume that *Apodemus* and *Myodes* play an important role as reservoir for *B. burgdorferi* s. l. in that region. Among the *B. garinii*-infected ticks, we found primarily OspA type 6 (90.3%) followed by OspA type 5 (8.1%). Double infections were detected in 19 of 225 positive ticks (8.4%) comparably frequent in nymphs and adults with *B. afzelii*/*B. burgdorferi sensu stricto* as the most frequent combination (41.1%) followed by *B. garinii* OspA type 6/*B. valaisiana* (21.%), *B. garinii* OspA type 5/*B. garinii* OspA type 6 (15.8%) and *B. valaisiana* type I/*B. valaisiana* type II (15.8%). The complementary occurrence of bird-transmitted genospecies (*B. garinii*, *B. valaisiana*) and those genospecies transmitted by small mammals (*B. afzelii*, *B. burgdorferi* s.s.) supports the hypothesis that host complement affects the spirochetes in the tick.

121 *B. burgdorferi* isolates obtained from *I. ricinus* were investigated for the prevalence of the different genospecies and OspA types of *B. burgdorferi* s.l.. The majority of isolates were single infections (115; 95.8%). *B. garinii* was the predominant species (69; 57%) followed by *B. burgdorferi* s. s. (26; 21.5%), *B. valaisiana* (14; 11,6%) and *B. afzelii* (6; 5,0%). Among the *B. garinii* isolates, we found all OspA types (3-7) except OspA type 4. Nine strains differed from previously reported restriction patterns. Sequencing of these strains revealed that all clustered to the *B. garinii* group. Four showed the greatest similarity with strains corresponding to OspA serotype 8. Five isolates with three different restriction patterns were closely related to *B. garinii* OspA serotype 3. These Data suggest that there is a greater genetic heterogeneity among *B. garinii* isolates then previously described.

2303 birds belonging to 35 species were live-captured in Reifenstein from March to Oktober 2004, to investigate their role as hosts of *B. burgdorferi* s.l. and its vector ticks. A total of 915 *I. ricinus* ticks collected from 254 birds belonging to 35 species was investigated for the prevalence of *B. burgdorferi* by PCR-RFLP analysis. Commercial DNA extraction kits have been tested concerning their suitability for direct extraction of spirochete-DNA from feeding ticks. The most sensitive kit was the Sigma GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit. Eight of the bird species harboured *B. burgdorferi* s.l. infected ticks. The prevalence of *B. burgdorferi* s.l. in the bird-feeding ticks was 19,4% (larvae: 20,7%; nymphs: 19,3%). The RFLP-analysis showed that *B. valaisiana* was present in 29/119 (23,8%) and 82/119 ticks (70,4%) were infected with *B. garinii* OspA type 6 as the most frequent OspA type. Double infections comprised two different *B. valaisiana* types or a mix of *B. garinii* OspA serotype 5 with serotype 6 as the most frequent mixed infections. The blackbird appeared to be the most effective host for *I. ricinus* and the main reservoir for *B. garinii* in our study area. There was no evidence that birds are reservoir for *B. valaisiana*.

In 2004, we investigated the presence of *B. burgdorferi* s. l. species in 622 ticks removed from humans throughout Thuringia. By using PCR-RFLP of the *OspA* gene, *B. burgdorferi* s. l. was amplified from 38 *I. ricinus* ticks (6.1%). *Borrelia afzelii* was found in 67.5%, *B. valaisiana* in 15.0% and *B. garinii* in 15.0% of positive ticks. In one tick a double infection with *B. valaisiana* *OspA* type II and *B. garinii* *OspA* type V was detected. Female adult ticks had the highest infection rate (11.7%), followed by nymphs (4.5%) and larvae (3.4%). The overall prevalence increased from spring (4.0%) to autumn (10.0%). Despite the high infestation in summer, the risk of infection may be the highest at this time of year. The low total prevalence is caused by the response from the host's immune system against less resistant *B. burgdorferi* s.l. strains within the ticks. The domination of *B. afzelii* may be due to its resistance against host serum.

LITERATURVERZEICHNIS

- Alitalo, A., Meri, T., Lankinen, H., Seppälä, I., Lahdenne, P., Hefty, P.S., Akins, D., and Meri, S.** (2002). Complement inhibitor factor H binding to Lyme disease spirochetes is mediated by inducible expression of multiple plasmid-encoded outer surface protein E paralogs. *J Immunol* **169**, 3847-3853.
- Anderson, J.M., Swanson, K.I., Schwartz, T.R., Glass, G.E., and Norris, D.E.** (2006). Mammal Diversity and Infection Prevalence in the Maintenance of Enzootic *Borrelia burgdorferi* along the Western Coastal Plains of Maryland. *Vector Borne Zoonotic Dis* **6**, 411-422.
- Anguita, J., Hedrick, M.N., and Fikrig, E.** (2003). Adaption of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 493-504.
- Assous, M.V., Postic, D., Paul, G., Nevot, P., and Baranton, G.** (1993). Western blot analysis of sera from Lyme borreliosis patients according to the genomic species of the *Borrelia* strains used as antigens. *Europ J Clin Microbiol* **12**, 261-268.
- Babista, S., Quaresma, A., Aires, T., Kurtenbach, K., Santos-Reis, M., Nicholson, M., and Collares-Pereira, M.** (2004). Lyme borreliosis spirochetes in questing ticks from mainland Portugal. *Int J Med Microbiol* **37**, 109-116.
- Balmelli, T., and Piffaretti, J.C.** (1995). Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res Microbiol* **146**, 329-340.
- Baranton, G., Marti Ras, N., and Postic, D.** (1998). Molecular epidemiology of the aetiological agents of Lyme borreliosis. *Wien Klin Wochenschr* **110**, 850-855.
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J.C., Assous, M., and Grimont, P.A.** (1992). Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 378-383.
- Barbour, A.G.** (1984). Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J Biol Med* **57**, 521-525.
- Baumgarten, B.U., Röllinghoff, M., and Bogdan, C.** (1999). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* and Granulocytic and Monocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks from Southern Germany. *J Clin Microbiol* **37**, 3448-3451.
- Bennet, L., Fraenkel, C.J., Garpmo, U., Halling, A., Ingman, M., Ornstein, K., Stjernberg, L., and Berglund, J.** (2006). Clinical appearance of erythema migrans caused by *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*-effect of the patient's sex. *Wien Klin Wochenschr* **118**, 531-537.
- Bigl, S., Müller, L., Pönitz, G., Mickel, C., and Klapper, B.M.** (1999). Untersuchungen zur Epidemiologie der Borreliose im Freistaat Sachsen 1997. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* **42**, 219-225.
- Breitner-Ruddock, S., Wurzner, R., Schulze, J., and Brade, V.** (1997). Heterogeneity in the complement-dependent bacteriolysis within the species of *Borrelia burgdorferi*. *Med Microbiol Immunol* **185**, 253-260.
- Brisson, D., and Dykhuizen, D.E.** (2004). ospC diversity in *Borrelia burgdorferi*: different hosts are different niches. *Genetics* **168**, 713-722.
- Brisson, D., and Dykhuizen, D.E.** (2006). A modest model explains the distribution and abundance of *Borrelia burgdorferi* strains. *Am J Trop Med Hyg* **74**, 615-622.
- Brown, R.N., and Lane, R.S.** (1992). Lyme disease in California: a novel enzootic transmission cycle of *Borrelia burgdorferi*. *Science* **256**, 1439-1442.
- Burgdorfer, W.** (1984). Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. *Yale J Biol Med* **57**, 515-520.

- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., and Davis, J.P.** (1982). Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? *Science* **216**, 1317-1319.
- Busch, U., Hizo-Teufel, C., Boehmer, R., Fingerle, V., Nitschko, H., Wilske, B., and Preac-Mursic, V.** (1996). Three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu lato, *B. afzelii*, and *B. garinii*) identified from cerebrospinal fluid isolates by pulsed field gel electrophoresis and PCR. *J Clin Microbiol* **34**, 1072-1078.
- Bykowski, T., Babb, K., von Lackum, K., Riley, S.P., Norris, S.J., and Stevenson, B.** (2006). Transcriptional regulation of the *Borrelia burgdorferi* antigenically variable VlsE surface protein. *J Bacteriol* **188**, 4879-4889.
- Carlsson, S.A., Granlund, H., Jansson, C., Nyman, D., and Wahlberg, P.** (2003). Characteristics of erythema migrans in *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii* infections. *Scand J Infect Dis* **35**, 31-33.
- Casjens, S., Palmer, N., Van Vugt, R., Huang W, M., Stevenson, B., Rosa, P., Lathigra, R., Sutton, G., Peterson, J., Dodson, R.J., Haft, D., Hickey, E., Gwinn, M., White, O., and Fraser, C.F.** (2000). A bacterial genome in flux: the twelve linear and nine circular extrachromosomal DNAs in an infectious isolate of the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Molecular Microbiology* **35**, 490-518.
- Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schafer, S.M., L., V., Concalves, L., Baptista, S., Vieira, M.L., and Cunha, C.** (2004). First isolation of *Borrelia lusitaniae* from a human patient. *J Clin Microbiol* **42**, 1316-1318.
- Craine, N.G., Nuttall, P.A., Marriott, A.C., and Randolph, S.E.** (1997). Role of grey squirrels and pheasants in the transmission of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete, in the U.K. *Folia Parasitol (Praha)* **44**, 155-160.
- De Boer, R., Hovius, K.E., Nohlmans, M.K.E., and Gray, J.S.** (1993). The woodmouse (*Apodemus sylvaticus*) as a reservoir of tick-transmitted spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) in the Netherlands. *Zentralbl Bakteriol* **279**, 404-416.
- De Michelis, S., Sewell, H.S., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Schouls, L.M., Benes, V., Holmes, E.C., and Kurtenbach, K.** (2000). Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks from mainland Portugal. *J Clin Microbiol* **38**, 2128-2133.
- De Silva, A.M., and Fikrig, E.** (1995). Growth and migration of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ticks* during blood feeding. *Am J Trop Med Hyg* **53**, 397-404.
- De Silva, A.M., Zeidner, N.S., Zhang, Y., Dolan, M.C., Piesman, J., and Fikrig, E.** (1999). Influence of outer surface proteinA antibody on *Borrelia burgdorferi* within feeding ticks. *Infection and Immunity* **67**, 30-35.
- Demaerschallck, I., Ben Messaoud, A., De Kesel, M., Hoyois, B., Lobet, Y., Hoet, P., Bigaignon, G., Bollen, A., and Godfroid, E.** (1995). Simultaneous presence of different *Borrelia burgdorferi* genospecies in biological fluids of Lyme disease patients. *J Clin Microbiol* **33**, 602-608.
- Derdakova, M., Beati, L., Petko, B., Stanko, M., and Fish, D.** (2002). Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single strand conformation polymorphism analysis of the *rrfA-rrlB* intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. *Appl Environ Microbiol* **69**, 509-516.
- Diza, E., Papa, A., Vezyri, E., Tsounis, S., Milonas, I., and Antoniadis, A.** (2004). *Borrelia valaisiana* in cerebrospinal fluid. *Emerg Infect Dis* **10**, 1692-1693.
- Dizij, A., and Kurtenbach, K.** (1995). *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. *Parasite Immunol* **17**, 177-183.

- Dolan, M.C., Maupin, G.O., Panella, N.A., Golde, W.T., and Piesman, J.** (1997). Vector competence of *Ixodes scapularis*, *I. spinipalpis*, and *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) in transmitting *Borrelia burgdorferi*, the etiologic agent of Lyme disease. *J Med Entomol* **34**, 128-135.
- Donnelly, J., and Peirce, M.A.** (1975). Experiments on the transmission of *Babesia divergens* to cattle by the tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol* **5**, 363-367.
- Dorn, W., Jacobi, U., and Flügel, C.** (1995). Zum Vorkommen von *Borrelia burgdorferi* in freilandgefangenen *Ixodes ricinus*-Entwicklungsstadien in Thüringen. In: Potsdamer Symposium. Süß, J., Hrsg (Darmsatdt: Weller), 162-174.
- Dorn, W., Sünder, U., Steil, B., and Flügel, C.** (1999). Seasonal pattern in the density of questing *Ixodes ricinus* L. 1758 (Acari: Ixodidae) and prevalence of *Borrelia* infection in selected habitats of Thuringia - a 3-year study. VIII International Conference on Lyme Borreliosis and other Tick-Borne Diseases.
- Dorn, W., Flügel, C., and Grübner, I.** (2002). Data on human-biting *Ixodes ricinus* ticks in a region of Thuringia (Germany). *Int J Med Microbiol* **291**, 219.
- Dorn, W., Messutat, S., Feldmann, A., and Sünder, U.** (1999). Seasonal variations in the infestation of rodents with *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae) and prevalence of *Borrelia* infections in a habitat of the Ilm-Valley (Thuringia, Germany). *Zentralbl Bakt* **289**, 696-697.
- Dykhuisen, D.E., Polin, D.S., Dunn, J.J., Wilske, B., Preac Mursic, V., Dattwyler, R.J., and Luft, B.J.** (1993). *Borrelia burgdorferi* is clonal: Implications for taxonomy and vaccine development. *Proc Natl Acad Sci* **90**, 10163-10167.
- Earnhart, C.G., Buckles, E.L., and Marconi, R.T.** (2007). Development of an OspC-based tetravalent, recombinant, chimeric vaccinogen that elicits bactericidal antibody against diverse Lyme disease spirochete strains. *Vaccine* **25**, 466-480.
- Eiffert, H., Karsten, A., Thomssen, R., and Christen, H.J.** (1998). Characterization of *Borrelia burgdorferi* strains in Lyme arthritis. *Scand J Infect Dis* **30**, 265-268.
- Eisen, L., Eisen, R.J., and Lane, R.S.** (2002). Seasonal activity patterns of *Ixodes pacificus* nymphs in relation to climatic conditions. *Med Vet Entomol* **16**, 235-244.
- Estrada-Pena, A., Oteo, J.A., Estrada-Pena, R., Gortazar, C., Osacar, J.J., Moreno, J.A., and Castella, J.** (1995). *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks (Acari: Ixodidae) from two different foci in Spain. *Exp Appl Acarol* **19**, 173-180.
- Fikrig, E., Barthold, S.W., Kantor, F.S., and Flavell, R.A.** (1990). Protection of mice against the Lyme disease agent by immunizing with recombinant OspA. *Science* **250**, 553-556.
- Fikrig, E., Telford, S.R.I., Barthold, S.W., Kantor, F.S., Spielman, A., and Flavell, R.A.** (1992a). Elimination of *Borrelia burgdorferi* from vektor ticks feeding on OspA-immunized mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **89**, 5418-5421.
- Fikrig, E., Barthold, S.W., Persing, D.H., Sun, X., Kantor, F.S., and Flavell, R.A.** (1992b). *Borrelia burgdorferi* strain 25015: characterization of outer surface protein A and vaccination against infection. *J Immunol* **2256-2260**.
- Fingerle, V., Hauser, U., Liegl, G., Petko, B., Preac-Mursic, V., and Wilske, B.** (1995). Expression of outer surface protein A and C of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus*. *J Clin Microbiol* **33**, 1867-1869.
- Fingerle, V., Munderloh, U.G., Liegl, G., and Wilske, B.** (1999). Coexistence of ehrlichiae of the phagocytophilia group with *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* from Southern Germany. *Med Microbiol Immunol* **188**, 145-149.

- Fingerle, V., Laux, H., Munderloh, U.G., Schulte-Spechtel, U., and Wilske, B.** (2000). Differential expression of outer surface proteins A and C by individual *Borrelia burgdorferi* in different genospecies. *Med Microbiol Immunol* **189**, 59-66.
- Fingerle, V., Rauser, S., Hammer, B., Kahl, O., Heimerl, C., Schulte-Spechtel, U., Gern, L., and Wilske, B.** (2002). Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. *J Clin Microbiol* **40**, 1456-1463.
- Fingerle, V., Michel, H., Hettche, G., Hizo-Teufel, C., and Wilske, B.** (2004). *Borrelia burgdorferi* s.l. OspA-types are widespread in Bavaria but show distinct local patterns. *Int J Med Microbiol* **293 Suppl 37**, 165-166.
- Fingerle, V., Schulte-Spechtel, U., Hizo-Teufel, C., König, A., and Wilske, B.** (2007). Game animals in the natural cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. IX International Jena Symposium on Tick-Borne Diseases, Jena.
- Fischer, J.R., Parveen, N., Magoun, L., and Leong, J.M.** (2003). Decorin- binding proteins A and B confer distinct mammalian cell type- specific attachment by *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete. *PNAS* **35**, 490-518.
- Fraenkel, C.-J., Garpmo, U., and Berglund, J.** (2002). Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. *J Clin Microbiol* **40**, 3308-3312.
- Frandsen, F., Bresciani, J., and Hansen, H.G.** (1995). Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Danish rodents. *Apmis* **103**, 247-253.
- Franke, J.** (2005). Dissertation, Anwendung etablierter Methoden bei der Untersuchung saisonaler Unterschiede in der Transmission von *Borrelia burgdorferi* sensu lato – Genospezies durch Kleinsäuger, *Lehrbereich für Lebensmittel- und Umwelthygiene*, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Fraser, C.M., Casjens, S., Huang, W.M., Sutton, G.G., Clayton, R., Lathigra, R., White, O., Ketchum, K.A., Dodson, R., Hickey, E.K., Gwinn, M., Dougherty, B., Tomb, J.F., Fleischmann, R.D., Richardson, D., Peterson, J., Kerlavage, A.R., Quackenbush, J., Salzberg, S., Hanson, M., van Vugt, R., Palmer, N., Adams, M.D., Gocayne, J., Weidman, J., Utterback, T., Watthey, L., McDonald, L., Artiach, P., Bowman, C., Garland, S., Fuji, C., Cotton, M.D., Horst, K., Roberts, K., Hatch, B., Smith, H.O., and Venter, J.C.** (1997). Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **390**, 580-586.
- Fukunaga, M., and Hamase, A.** (1995). Outer surface protein C gene sequence analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Japan. *J Clin Microbiol* **33**, 2415-2420.
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K., and Nakao, M.** (1996). *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from *Ixodid* ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol Immunol* **40**, 877-881.
- Gern, L., Toutoungi, L.N., Hu, C.M., and Aeschlimann, A.** (1991). *Ixodes* (Pholeoixodes) *hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. *Med Vet Entomol* **5**, 431-435.
- Gern, L., Siegenthaler, M.C., Hu, M., Leuba-Garcia, S., Humair, P.F., and Moret, J.** (1994). *Borrelia burgdorferi* in rodents (*Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*): duration and enhancement of infectivity for *Ixodes ricinus* ticks. *Eur J Epidemiol* **10**, 75-80.
- Gern, L., and Rais, O.** (1996). Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between co feeding *Ixodes ricinus* ticks (Acari:Ixodidae). *J Med Entomol* **33**, 189-192.
- Gern, L., Rouvinez, E., Toutoungi, L.N., and Godfroid, E.** (1997). Transmission cycles of *Borrelia burgdorferi* sensu lato involving *Ixodes ricinus* and/or *I. hexagonus* ticks and the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*, in suburban and urban areas in Switzerland. *Folia Parasit* **44**, 309-314.

- Gern, L., Estrada-Pena, A., Frandsen, F., Gray, J.S., Jaenson, T.G., Jongejan, F., Kahl, O., Korenberg, E., Mehl, R., and Nuttall, P.A. (1998). European reservoir hosts of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zentralbl Bakteriell Hyg 28, 196-204.
- Gern, L., Hu, C.M., Kocianova, E., Vyrostekova, V., and Rehacek, J. (1999). Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates obtained from *Ixodes ricinus* ticks collected in Slovakia. Eur J Epidemiol 15, 665-669.
- Ginsberg, H.S., Buckley, P.A., Balmforth, M.G., Zhioua, E., Mitra, S., and Buckley, F.G. (2005). Reservoir competence of native North American birds for the lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. J Med Entomol 42, 445-449.
- Godfroid, E., Min Hu, C., Humair, P.F., Bollen, A., and Gern, L. (2003). PCR-reverse line blot typing method underscores the genomic heterogeneity of *Borrelia valaisiana* species and suggests its potential involvement in Lyme disease. J Clin Microbiol 41, 3690-3698.
- Gray, J.S., Kahl, O., Janetzki-Mittman, C., Stein, J., and Guy, E. (1994). Acquisition of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes ricinus* ticks fed on the European hedgehog, *Erinaceus europaeus* L. Exp Appl Acarol 18, 485-491.
- Gray, J.S., Kahl, O., Robertson, J.N., Daniel, M., Estrada-Pena, A., Gettinby, G., Jaenson, T.G., Jensen, P., Jongejan, F., Korenberg, E., Kurtenbach, K., and Zeman, P. (1998). Lyme borreliosis habitat assessment. Zentralbl Bakteriell 287, 211-228.
- Gray, J.S., Kirstein, F., Robertson, J.N., Stein, J., and Kahl, O. (1999). *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. Exp Appl Acarol 23, 717-729.
- Gray, J.S., Robertson, J.N., and Key, S. (2000). Limited role of rodents as reservoirs of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Ireland. Eur J Epidemiol 16, 101-103.
- Gryczynska, A., Zgodka, A., Ploski, R., and Siemiatkowski, M. (2004). *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in passerine birds from the Mazurian Lake region (Northeastern Poland). Avian Pathol 33, 69-75.
- Gylfe, Olsen, B., Strasevicius, D., Marti Ras, N., Weihe, P., Noppa, L., Ostberg, Y., Baranton, G., and Bergstrom, S. (1999). Isolation of Lyme disease *Borrelia* from puffins (*Fratercula arctica*) and seabird ticks (*Ixodes uriae*) on the Faeroe Islands. J Clin Microbiol 37, 890-896.
- Gylfe, A., Bergstrom, S., Lundstrom, J., and Olsen, B. (2000). Reactivation of *Borrelia* infection in birds. Nature 403, 724-725.
- Gylfe, A., Yabuki, M., Drotz, M., Bergstrom, S., Fukunaga, M., and Olsen, B. (2001). Phylogeographic relationships of *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae) and their significance to transequatorial dispersal of *Borrelia garinii*. Hereditas 134, 195-199.
- Halouzka, J., Juricova, Z., Matlova, L., and Hubalek, Z. (1995). Borreliae in larval *Ixodes ricinus* ticks. Med Vet Entomol 9, 2005-2006.
- Hanincova, K., Taragelova, V., Koci, J., Schafer, S.M., Hails, R., Ullmann, A.J., Piesman, J., Labuda, M., and Kurtenbach, K. (2003a). Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. Appl Environ Microbiol 69, 2825-2830.
- Hanincova, K., Schafer, S.M., Etti, S., Sewell, H.S., Taragelova, V., Ziak, D., Labuda, M., and Kurtenbach, K. (2003b). Association of *Borrelia afzelii* with rodents in Europe. Parasitology 126, 11-20.
- Hartelt, K., Oehme, R., Frank, H., Brockmann, S.O., Hassler, D., and Kimmig, P. (2004). Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. Int J Med Microbiol 37, 86-92.

- Hauser, U., Lehnert, G., and Wilske, B.** (1999). Validity of interpretation criteria for standardized Western blots (immunoblots) for serodiagnosis of Lyme borreliosis based on sera collected throughout Europe. *J Clin Microbiol* **37**, 2241-2247.
- Heidrich, J., Schonberg, A., Steuber, S., Nockler, K., Schulze, P., Voigt, W.P., and Schein, E.** (1999). Investigation of skin samples from red foxes (*Vulpes vulpes*) in eastern Brandenburg (Germany) for the detection of *Borrelia burgdorferi* s. l. *Zentralbl Bakt* **289**, 666-672.
- Hellwage, J., Meri, T., Heikkila, T., Alitalo, A., Panelius, J., Lahdenne, P., Seppala, I.J., and Meri, S.** (2001). The complement regulator factor H binds to the surface protein OspE of *Borrelia burgdorferi*. *J Biol Chem* **276**, 8427-8435.
- Hildebrandt, A., Schmidt, K.H., Wilske, B., Dorn, W., Straube, E., and Fingerle, V.** (2003). Prevalence of four species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and coinfection with *Anaplasma phagocytophila* in *Ixodes ricinus* ticks in central Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**, 364-367.
- Hodzic, E., Feng, S., Freet, K.J., Borjesson, D.L., and Barthold, S.W.** (2002). *Borrelia burgdorferi* population kinetics and selected gene expression at the host-vector interface. *Infect Immun* **70**, 3382-3388.
- Honarvar, N., Schaible, U.E., Galanos, C., Wallich, R., and Simon, M.M.** (1994). A 14,000 MW lipoprotein and a glycolipid-like structure of *Borrelia burgdorferi* induce proliferation and immunoglobulin production in mouse B cells at high frequencies. *Immunology* **82**, 389-396.
- Horst, H.** (2003) In: Zeckenborreliose Lyme- Krankheit bei Mensch und Tier. Horst, H., Hrsg (Balingen: Spitta Verlag).
- Hovis, K.M., Tran, E., Sundry, C.M., Buckles, E., McDowell, J.V., and Marconi, R.T.** (2006). Selective binding of *Borrelia burgdorferi* OspE paralogs to factor H and serum proteins from diverse animals: possible expansion of the role of OspE in Lyme disease pathogenesis. *Infect Immun* **74**, 1967-1972.
- Hovius, J.W., Hovius, K.E., Oei, A., Houwers, D.J., and van Dam, A.P.** (2000). Antibodies against specific proteins of and immobilizing activity against three strains of *Borrelia burgdorferi* sensu lato can be found in symptomatic but not in infected asymptomatic dogs. *J Clin Microbiol* **38**, 2611-2621.
- Hovius, J.W., Li, X., Ramamoorthi, N., van Dam, A.P., Barthold, S.W., van der Poll, T., Speelman, P., and Fikrig, E.** (2007). Coinfection with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia garinii* alters the course of murine Lyme borreliosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **49**, 224-234.
- Hu, C.M., Wilske, B., Fingerle, V., Lobet, Y., and Gern, L.** (2001). Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J Clin Microbiol* **39**, 1169-1171.
- Hubalek, Z., Anderson, J.F., Halouzka, J., and Hajek, V.** (1996). Borreliae in immature *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) ticks parasitizing birds in the Czech Republic. *J Med Entomol* **33**, 766-771.
- Hubalek, Z., Halouzka, J., and Juricova, Z.** (2003a). Longitudinal surveillance of the tick *Ixodes ricinus* for borreliae. *Medical and Veterinary Entomology* **17**, 46-51.
- Hubalek, Z., Halouzka, J., and Juricova, Z.** (2003b). Borrelia in ticks biting humans and prevention of Lyme borreliosis. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* **52**, 13-17.
- Hubalek, Z., Stunzner, D., Halouzka, J., Sixl, W., Wendelin, I., Juricova, Z., and Sanogo, Y.O.** (2003c). Prevalence of borreliae in ixodid ticks from a floodplain forest ecosystem. *Wien Klin Wochenschr* **115**, 121-124.
- Huegli, D., Hu, C.M., Humair, P.F., Wilske, B., Gern, L., Fingerle, V., and Lobet, Y.** (2002). *Apodemus* species mice are reservoir hosts of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 in Switzerland. Transmission of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 to BALB/c mice by *Ixodes ricinus* ticks collected in the field. *J Clin Microbiol* **40**, 4735-4737.

- Humair, P.F.** (2002). Birds and *Borrelia*. *Int J Med Microbiol* **291 Suppl 33**, 70-74.
- Humair, P.F., Rais, O., and Gern, L.** (1999). Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology* **118**, 33-42.
- Humair, P.F., and Gern, L.** (1998). Relationship between *Borrelia burgdorferi* sensu lato species, red squirrels (*Sciurus vulgaris*) and *Ixodes ricinus* in enzootic areas in Switzerland. *Acta Trop* **69**, 213-227.
- Humair, P.F., Peter, O., Wallich, R., and Gern, L.** (1995). Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. *J Med Entomol* **32**, 433-438.
- Humair, P.F., Postic, D., Wallich, R., and Gern, L.** (1998). An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. *Zentralbl Bakteriol* **287**, 521-538.
- Huppertz, H.I., Bohme, M., Standaert, S.M., Karch, H., and Plotkin, S.A.** (1999). Incidence of Lyme borreliosis in the Würzburg region of Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**, 697-703.
- Hyde, J.A., Trzeciakowski, J.P., and Skare, J.T.** (2007). *Borrelia burgdorferi* alters its gene expression and antigenic profile in response to CO₂ levels. *J Bacteriol* **189**, 437-445.
- Ica, A., Vatansever, Z., Yildirim, A., Duzlu, O., and Inci, A.** (2007). Detection of Theileria and Babesia species in ticks collected from cattle. *Vet Parasitol* **148**, 156-160.
- Jacobi, U., and Dorn, W.** (1995). Zum Vorkommen und zur Verbreitung von Zecken (*I. ricinus*) in Thüringen. In: Potsdamer Symposium, Süss, J., Hrsg (Darmstadt: Weller), 102-118.
- Jauris-Heipke, S., Liegl, G., Preac Mursic, V., Rößler, D., Schwab, E., Soutschek, E., Will, G., and Wilske, B.** (1995). Molecular analysis of the gene encoding the outer surface protein C (OspC) of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: relationship to OspA genotyp and evidence of lateral gene exchange of OspC. *J Clin Microbiol* **33**, 1860-1866.
- Jenkins, A., Kristiansen, B.E., Allum, A.G., Aakre, R.K., Strand, L., Kleveland, E.J., van de Pol, I., and Schouls, L.** (2001). *Borrelia burgdorferi* sensu lato and Ehrlichia spp. in *Ixodes ticks* from southern Norway. *J Clin Microbiol* **39**, 3666-3671.
- Jouda, F., Perret, J.L., and Gern, L.** (2004). Density of questing *Ixodes ricinus* nymphs and adults infected by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Switzerland: spatio-temporal pattern at a regional scale. *Vector Borne Zoonotic Dis* **4**, 23-32.
- Junttila, J., Peltomaa, M., Soini, H., Marjamäki, M., and Viljanen, M.K.** (1999). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J Clin Microbiol* **37**, 1361-1365.
- Kahl, O., Gern, L., Eisen, L., and Lane, R.S.** (2002). Ecological Research on *Borrelia burgdorferi* sensu lato: Terminology and Some Methodological Pitfalls. In: Lyme Borreliosis Biology, Epidemiology and Control, J.S. Gray, O. Kahl, R.S. Lane, and G. Stanek, eds (New York: CABI Publishing), 29-46.
- Kaiser, A., Seitz, A., and Strub, O.** (2002). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the nightingale (*Luscinia megarhynchos*) and other passerine birds. *Int J Med Microbiol* **291 Suppl 33**, 75-79.
- Kampen, H., Rötzel, D., Kurtenbach, K., Maier, W.A., and Seitz, H.M.** (2004). Substantial rise in the prevalence of Lyme Borreliosis spirochetes in a region of western Germany over a 10-year period. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1576-1582.
- Kawabata, H., Masuzawa, T., and Yanagihara, Y.** (1993). Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol Immunol* **37**, 843-848.

- Khanakah, G., Kocianova, E., Vyrostekova, V., Rehacek, J., Kundi, M., and Stanek, G.** (2006). Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from north eastern Austria. *Wien Klin Wochenschr* **118**, 754-758.
- Khasnis, A.A., and Nettleman, M.D.** (2005). Global warming and infectious disease. *Arch Med Res* **36**, 689-696.
- Kirstein, F., Rijpkema, S., Molkenboer, M., and Gray, J.S.** (1997). Local variations in the distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genomospecies in *Ixodes ricinus* ticks. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1102-1106.
- Korenberg, E., Kovalevskii, Y.V., and Gorelova, N.B.** (2003). Tick-host-Borrelia population interactions: long-term records in Eastern Europe. *Exp Appl Acarol* **28**, 225-229.
- Kraiczy, P., Hunfeld, K.P., Breitner-Ruddock, S., Würzner, R., Acker, G., and Brade, V.** (2000). Comparison of two laboratory methods for the determination of serum resistance in *Borrelia burgdorferi* isolates. *Immunobiology* **201**, 406-419.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Brade, V., and Zipfel, P.F.** (2001). Further characterization of complement regulator-acquiring surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **69**, 7800-7809.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Zipfel, P.F., and Brade, V.** (2001b). Mechanism of complement resistance of pathogenic *Borrelia burgdorferi* isolates. *Int Immunopharmacol* **1**, 393-401.
- Kraiczy, P., Skerka, C., Kirschfink, M., Zipfel, P.F., and Brade, V.** (2002). Immune evasion of *Borrelia burgdorferi*: insufficient killing of the pathogens by complement and antibody. *Int J Med Microbiol* **291 Suppl 33**, 141-146.
- Kraiczy, P., Rossmann, E., Brade, V., Simon, M.M., Skerka, C., Zipfel, P.F., and Wallich, R.** (2006). Binding of human complement regulators FHL-1 and factor H to CRASP-1 orthologs of *Borrelia burgdorferi*. *Wien Klin Wochenschr* **118**, 669-676.
- Krause, P.J., Telford, S.R.I., Spielman, A., Sikand, V., Ryan, R., Christanson, D., Burke, G., Brassard, P., Pollack, R., Peck, J., and Persing, D.H.** (1996). Concurrent Lyme disease and babesiosis: Evidence for increased severity and duration of illness. *J Am Med Assoc* **275**, 1657-1660.
- Kurtenbach, K., Dizij, A., Seitz, A., Margos, G., Moter, S.E., Kramer, M.D., Wallich, R., Schaible, U.E., and Simon, M.M.** (1994). Differential immune response to *Borrelia burgdorferi* in European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *Infect Immun* **62**, 5344-5352.
- Kurtenbach, K., Kampen, H., Dizij, A., Arndt, S., Seitz, H.M., Schaible, U.E., and Simon, M.M.** (1995). Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. *J Med Entomol* **32**, 807-817.
- Kurtenbach, K., Sewell, H.S., Ogden, N.H., Randolph, S.E., and Nuttall, P.A.** (1998a). Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. *Infect Immun* **66**, 1248-1251.
- Kurtenbach, K., Peacey, M., Rijpkema, S.G., Hoodless, A.N., Nuttall, P.A., and Randolph, S.E.** (1998b). Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1169-1174.
- Kurtenbach, K., Carey, D., Hoodless, A.N., Nuttall, P.A., and Randolph, S.E.** (1998c). Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. *J Med Entomol* **35**, 77-81.
- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Sewell, H.S., Etti, S., Schafer, S.M., Hails, R., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Hanincova, K., Labuda, M., Bormane, A., and Donaghy, M.** (2001). Distinct combinations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies found in individual questing ticks from Europe. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4926-4929.

- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Etti, S., Schäfer, S.M., Sewell, H.S., Brade, V., and Kraiczy, P.** (2002a). Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato - the key role of host complement. Trends Microbiol **10**, 74-79.
- Kurtenbach, K., De Michelis, S., Sewell, H.S., Etti, S., Schafer, S.M., Holmes, E., Hails, R., Collares-Pereira, M., Santos-Reis, M., Hanincova, K., Labuda, M., Bormane, A., and Donaghy, M.** (2002b). The key roles of selection and migration in the ecology of Lyme borreliosis. Int J Med Microbiol **291 Suppl 33**, 152-154.
- Kurtenbach, K., Schäfer, S.M., Sewell, H.S., Peacey, M., Hoodless, A.N., Nuttall, P.A., and Randolph, S.E.** (2002c). Differential Survival of Lyme Borreliosis Spirochetes in Ticks That Feed on Birds. Infect Immun **70**, 5893-5895.
- Labuda M., K.u.O., Lysý.** (1997). Tick- borne encephalitis virus natural foci in Slovakia: ticks, rodents, and goats. In: Tick- borne encephalitis and Lyme Borreliosis. In: Potsdam Symposia, Kahl, O., Süss, J., eds (Lengerich: Pabst Science Publishers), 34-36.
- Lane, R.S.** (1994). Competence of ticks as vectors of microbial agents with an emphasis on *Borrelia burgdorferi*. In Ecological Dynamics of Tick-borne Zoonoses, D.E. Sonenshine and T.N. Mather, eds (Oxford: Oxford University Press), 45-67.
- Lane, R.S., Mun, J., Eisen, R.J., and Eisen, L.** (2005). Western gray squirrel (Rodentia: Sciuridae): a primary reservoir host of *Borrelia burgdorferi* in Californian oak woodlands. J Med Entomol **42**, 388-396.
- Lawrenz, M.B., Wooten, R.M., and Norris, S.J.** (2004). Effects of vlsE complementation on the infectivity of *Borrelia burgdorferi* lacking the linear plasmid lp28-1. Infect Immun **72**, 6577-6585.
- Lawrie, C.H., und Nuttall, P.A.** (2001). Antigenic profile of Ixodes ricinus: effect of developmental stage, feeding time and the response of different host species. Parasite Immunol **23**, 549-556.
- Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Peter, O., and Baranton, G.** (1997). Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int J Syst Bacteriol **47**, 921-925.
- Lebech, A.-M., Hansen, K., Rutledge, B.J., Kolbert, C.P., Rys, P.N., and Persing, D.H.** (1998). Diagnostic detection and direct genotyping of *Borrelia burgdorferi* by Polymerase Chain Reaction in cerebrospinal fluid in Lyme borreliosis. Molecular Diagnosis **3**, 131-141.
- Lebech, A.M.** (2002). Polymerase chain reaction in diagnosis of *Borrelia burgdorferi* infections and studies on taxonomic classification. APMIS Suppl, 1-40.
- Lencakova, D., Hizo-Teufel, C., Petko, B., Schulte-Spechtel, U., Stanko, M., Wilske, B., and Fingerle, V.** (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s. l. OspA types in Ixodes ricinus ticks from selected localities in Slovakia and Poland. Int J Med Microbiol **296S1**, 108-118.
- Levin, M.L., and Fish, D.** (2000). Acquisition of coinfection and simultaneous transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by Ixodes scapularis ticks. Infect Immun **68**, 2183-2186.
- Li, X., Neelakanta, G., Liu, X., Beck, D.S., Kantor, F.S., Fish, D., Anderson, J.F., and Fikrig, E.** (2007). Role of outer surface protein D in the *Borrelia burgdorferi* life cycle. Infect Immun **75**, 4237-4244.
- Liang, F.T., Brown, E.L., Wang, T., Iozzo, R.V., and Fikrig, E.** (2004). Protective niche for *Borrelia burgdorferi* to evade humoral immunity. Am J Pathol **165**, 977-985.
- Liang, F.T., and Philipp, M.T.** (1999). Analysis of antibody response to invariable regions of VlsE, the variable surface antigen of *Borrelia burgdorferi*. Infect Immun **67**, 6702-6706.
- Liang, F.T., Yan, J., Mbow, M.L., Sviat, S.L., Gilmore, R.D., Mamula, M., and Fikrig, E.** (2004). *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host immune responses. Infect Immun **72**, 5759-5767.

- Liebisch, A.** (1991). Biologie und Ökologie der Zecken. In: Einheimische Zeckenborreliose (Lyme Borreliose) bei Mensch und Tier, Horst, H, ed (Erlangen: perimed-Fachbuchverl.-Ges.), 158-176.
- Liebisch, G.** (1997). Der Nachweis von Borrelien bei Haus- und Wildtieren: Patient oder Reservoir der Lyme- Borreliose? In 22. Kongress der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (Bad Nauheim), 265-270.
- Liebisch, G., Liebisch, A., and Dyck, A.** (1995). Studies on the tick bites in humans in Germany and infections with *Borrelia burgdorferi*. Zentralbl Bakt Hyg **282**, 179-180.
- Liveris, D., Varde, S., Iyer, R., Koenig, S., Bittker, S., Cooper, D., McKenna, D., Nowakowski, J., Nadelman, R.B., Wormser, G.P., and Schwartz, I.** (1999). Genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* in lyme disease patients as determined by culture versus direct PCR with clinical specimens. J Clin Microbiol **37**, 565-569.
- Loebermann, M., Fingerle, V., Lademann, M., Fritzsche, C., and Reisinger, E.C.** (2006). *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* coinfection. Emerg Infect Dis **12**, 353-355.
- Logar, M., Ruzic-Sabljic, E., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Cimperman, J., Jurca, T., and Strle, F.** (2004). Comparison of erythema migrans caused by *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*. Infection **32**, 15-19.
- Lottmann, H., Wilske, B., and Herrmann, H.** (1996). Characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from *Ixodes ricinus* in Mecklenburg-Vorpommern, Germany. Med Microbiol Immunol (Berl) **184**, 181-184.
- Lovrich, S.D., Callister, S.M., Lim, L.C., DuChateau, B.K., and Schell, R.F.** (1994). Seroprotective groups of Lyme borreliosis spirochetes from North America and Europe. J Infect Dis **170**, 115-121.
- Lunemann, J.D., Zarmas, S., Priem, S., Franz, J., Zschenderlein, R., Aberer, E., Klein, R., Schouls, L., Burmester, G.R., and Krause, A.** (2001). Rapid typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in specimens from patients with different manifestations of Lyme borreliosis. J Clin Microbiol **39**, 1130-1133.
- Maetzel, D., Maier, W.A., and Kampen, H.** (2005). *Borrelia burgdorferi* infection prevalences in questing *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) in urban and suburban Bonn, western Germany. Parasitol Res **95**, 5-12.
- Maiwald, M., Oehme, R., March, O., Petney, T.N., Kimmig, P., Naser, K., Zappe, H.A., Hassler, D., and von Knebel Doeberitz, M.** (1998). Transmission risk of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from *Ixodes ricinus* ticks to humans in southwest Germany. Epidemiol Infect **121**, 103-108.
- Mannelli, A., Nebbia, P., Tramuta, C., Grego, E., Tomassone, L., Ainardi, R., Venturini, L., De Meneghi, D., and Meneguz, P.G.** (2005). *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection in larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) feeding on blackbirds in northwestern Italy. J Med Entomol **42**, 168-175.
- Marconi, R.T., and Garon, C.F.** (1992). Phylogenetic analysis of the genus *Borrelia*: a comparison of North American and European isolates of *Borrelia burgdorferi*. J Bacteriol **174**, 241-244.
- Marconi, R.T., Liveris, D., and Schwartz, I.** (1995). Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. J Clin Microbiol **33**, 2427-2434.
- Marconi, R.T., Hohenberger, S., Jauris-Heipke, S., Schulte-Spechtel, U., Lavoie, C.P., Rößler, D., and Wilske, B.** (1999). Genetic analysis of *Borrelia garinii* OspA serotyp 4 strains associated with neuroborreliosis: evidence for extensive genetic homogeneity. J Clin Microbiol **37**, 3965-3970.
- Marie-Angele, P., Lommano, E., Humair, P.F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., Jenni, and Gern, L.** (2006). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. Appl Environ Microbiol **72**, 976-979.

- Masuzawa, T., Suzuki, H., Kawabata, H., Ishiguro, F., Takada, N., and Yanagihara, Y.** (1996). Characterization of *Borrelia* spp. isolated from the tick, *Ixodes tanuki* and small rodents in Japan. *J Wildl Dis* **32**, 565-571.
- Masuzawa, T., Takada, N., Kudeken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., and Ezaki, T.** (2001). *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1817-1824.
- Masuzawa, T., Hashimoto, N., Kudeken, M., Kadosaka, T., Nakamura, M., Kawabata, H., Koizumi, N., and Imai, Y.** (2004). New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. *J Med Microbiol* **53**, 421-426.
- Matuschka, F.-R., Fischer, P., Heiler, M., Blümcke, S., and Spielman, A.** (1992). Stage-associated risk of transmission of the Lyme disease spirochete by European *Ixodes* ticks. *Parasitology Research* **78**, 1187-1189.
- Mehnert, W., and Krause, G.** (2005). Surveillance of Lyme borreliosis in Germany, 2002 and 2003. *Euro Surveill* **10**.
- Michel, H., Wilske, B., Hettche, G., Gottner, G., Heimerl, C., Reischl, U., Schulte-Spechtel, U., and Fingerle, V.** (2003). An ospA-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism-based method for sensitive detection and reliable differentiation of all European *Borrelia burgdorferi* sensu lato species and OspA types. *Med Microbiol Immunol* **22**, 364-367.
- Michalik, J., Hofman, T., Buczek, A., Skoracki, M., and Sikora, B.** (2003). *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks collected from vegetation and small rodents in recreational areas of the city of Poznan. *J Med Entomol* **40**, 690-697.
- Michalik, J., Skotarczak, B., Skoracki, M., Wodecka, B., Sikora, B., Hofman, T., Rymaszewska, A., and Sawczuk, M.** (2005). *Borrelia burgdorferi* sensu stricto in yellow-necked mice and feeding *Ixodes ricinus* ticks in a forest habitat of west central Poland. *J Med Entomol* **42**, 850-856.
- Michalik, J., Wodecka, B., Skoracki, M., Sikora, B., and Stanczak, J.** (2007). Prevalence of avian-associated *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies in *Ixodes ricinus* ticks collected from blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*). IX International Jena Symposium on Tick-Borne Diseases. Jena
- Moro, M.H., Zegarra-Moro, O.L., and Persing, D.H.** (2006). *Babesia microti* and *Borrelia burgdorferi* coinfection associated with increased severity of arthritis. *J Infect Dis* **194**, 716.
- Morozova, O.V., Dobrotvorsky, A.K., Livanova, N.N., Tkachev, S.E., Bakhvalova, V.N., Beklemishev, A.B., and Cabello, F.C.** (2002). PCR detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, Tick-Borne Encephalitis virus, and the human Granulocytic Ehrlichiosis agent in *Ixodes persulcatus* ticks from Western Siberia, Russia. *J Clin Microbiol* **40**, 3802-3804.
- Mulic, R., Antonijevic, S., Klismanic, Z., Ropac, D., and Lucev, O.** (2006). Epidemiological characteristics and clinical manifestations of Lyme borreliosis in Croatia. *Mil Med* **171**, 1105-1109.
- Nahimana, I., Gern, L., Blanc, D.S., Praz, G., Francioli, P., and Peter, O.** (2004). Risk of *Borrelia burgdorferi* infection in western Switzerland following a tick bite. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**, 603-608.
- Nakao, M., Miyamoto, K., and Fukunaga, M.** (1994). Lyme disease spirochetes in Japan: enzootic transmission cycles in birds, rodents, and *Ixodes persulcatus* ticks. *J Infect Dis* **170**, 878-882.
- Nakao, M., and Sato, Y.** (1996). Refeeding activity of immature ticks of *Ixodes persulcatus* and transmission of Lyme disease spirochete by partially fed larvae. *J Parasitol* **84**, 669-672.
- Nelson, D.R., Rooney, S., Miller, N.J., and Mather, T.N.** (2000). Complement-mediated killing of *Borrelia burgdorferi* by non-immune sera from sika deer. *J Parasitol* **86**, 1232-1238.

- Nuttall, P.A.** (1999). Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. Zbl. Bakteriologie. **289**, 492-505.
- Nuttall, P.A., Paesen, G.C., Lawrie, C.H., and Wang, H.** (2000). Vector-host interactions in disease transmission. J Mol Microbiol Biotechnol **2**, 381-386.
- O'Connell, S., Granstrom, M., Gray, J.S., and Stanek, G.** (1998). Epidemiology of European Lyme borreliosis. Zentralbl. Bakteriologie. **287**, 229-240.
- Obonyo, M., Munderloh, U.G., Fingerle, V., Wilske, B., and Kurtti, T.J.** (1999). *Borrelia burgdorferi* in tick cell culture modulates expression of outer surface proteins A and C in response to temperature. J Clin Microbiol **37**, 2137-2141.
- Oehme, R., Hartelt, K., Backe, H., Brockmann, S., and Kimmig, P.** (2002). Foci of tick-borne diseases in southwest Germany. Int J Med Microbiol **291 Suppl 33**, 22-29.
- Ohlenbusch, A., R., M.F., Richter, D., Christen, H.J., Thomsen, R., Spielman, A., and Eiffert, H.** (1996). Etiology of the acrodermatitis chronica atrophicans lesion in Lyme disease. Infect Dis **174**, 421-423.
- Ohnishi, J., Schneider, B., Messer, W.B., Piesman, J., and de Silva, A.M.** (2003). Genetic variation at the vlsE locus of *Borrelia burgdorferi* within ticks and mice over the course of a single transmission cycle. J Bacteriol **185**, 4432-4441.
- Olsen, B., Jaenson, T.G., Noppa, L., Bunikis, J., and Bergstrom, S.** (1993). A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. Nature **362**, 340-342.
- Olsen, B., Duffy, D.C., Jaenson, T.G., Gylfe, A., Bonnedahl, J., and Bergstrom, S.** (1995). Transhemispheric exchange of Lyme disease spirochetes by seabirds. J Clin Microbiol **33**, 3270-3274.
- Olsen, B., Jaenson, T.G., and Bergstrom, S.** (1995). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. Appl Environ Microbiol **61**, 3082-3087.
- Ornstein, K., Berglund, J., Bergstrom, S., Norrby, R., and Barbour, A.G.** (2002). Three in Sweden major Lyme *Borrelia* genospecies (*Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii* and *B. garinii*) identified by PCR in cerebrospinal fluid from patients with neuroborreliosis. Scand J Infect Dis **34**, 341-346.
- Owen, D.C.** (2006). Is Lyme disease always poly microbial?--The jigsaw hypothesis. Med Hypotheses **67**, 860-864.
- Page, R.D.** (1996). TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci **12**, 357-358.
- Pal, U., de Silva, A.M., Montgomery, R.R., Fish, D., Anguita, J., Anderson, J.F., Lobet, Y., and Fikrig, E.** (2000). Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. J Clin Invest **106**, 561-569.
- Pal, U., Yang, X., Cheng, M., Bockenstedt, L.K., Anderson, J.F., Flavell, R.A., Norgard, M.V., and Fikrig, E.** (2004). OspC facilitates *Borrelia burgdorferi* invasion of *Ixodes scapularis* salivary glands. J Clin Invest **113**, 220-230.
- Parola, P., and Raoult, D.** (2001). [Molecular tools in the epidemiology of tick-borne bacterial diseases]. Ann Biol Clin **59**, 177-182.
- Pawelczyk, A., and Sinski, E.** (2000). Prevalence of IgG antibodies response to *Borrelia burgdorferi* s.l. in populations of wild rodents from Mazury lakes district region of Poland. Ann Agric Environ Med **7**, 79-83.

- Pawelczyk, A., Ogrzewalska, M., Zadrozna, I., and Sinski, E.** (2004). The zoonotic reservoir of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the Mazury Lakes district of North-Eastern Poland. *Int J Med Microbiol* **293 Suppl 37**, 167-171.
- Peavey, C.A., and Lane, R.S.** (1995). Transmission of *Borrelia burgdorferi* by *Ixodes pacificus* nymphs and reservoir competence of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) infected by tick-bite. *J Parasitol* **81**, 175-178.
- Pechova, J., Stepanova, G., Kovar, L., and Kopecky, J.** (2002). Tick salivary gland extract-activated transmission of *Borrelia afzelii* spirochetes. *Folia Parasit* **49**, 153-159.
- Peter, O., and Bretz, A.G.** (1992). Polymorphism of outer surface proteins of *Borrelia burgdorferi* as a tool for classification. *Zentralbl Bakteri* **277**, 28-33.
- Peter, O., Bretz, A.-G., Postic, D., and Dayer, E.** (1997). Association of distinct species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with neuroborreliosis in Switzerland. *Clin Microbiol Infect* **3**, 423-431.
- Piccolin, G., Benedetti, G., Doglioni, C., Lorenzato, C., Mancuso, S., Papa, N., Pitton, L., Ramon, M.C., Zasio, C., and Bertiato, G.** (2006). A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously Ehrlichia) *phagocytophilum*, Rickettsia, and Babesia in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis* **6**, 24-31.
- Pichon, B., Egan, D., Rogers, M., and Gray, J.S.** (2003). Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* **40**, 723-731.
- Pichon, B., Rogers, M., Egan, D., and Gray, J.S.** (2005). Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. *Vector Borne Zoonotic Dis* **2**, 172-180.
- Picken, R.N., Cheng, Y., Strle, F., and Picken, M.M.** (1996). Patient isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities of strain 25015. *J Infect Dis* **174**, 1112-1115.
- Picken, R.N., Strle, F., Picken, M.M., Ruzic-Sabljic, E., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., and Cimperman, J.** (1998). Identification of three species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, and *B. afzelii*) among isolates from acrodermatitis chronica atrophicans lesions. *J Invest Dermatol* **110**, 211-214.
- Piesman, J.** (1991). Experimental acquisition of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi* by larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) during partial blood meals. *J Med Entomol* **28**, 259-262.
- Piesman, J., Oliver, J.O., and Sinsky, R.J.** (1990). Growth kinetics of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) in vector ticks (*Ixodes dammini*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **42**, 352-357.
- Porcella, S., and Schwan, T.G.** (2001). *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum*: a comparison of functional genomics, environmental adaptations, and pathogenic mechanisms. *J Clin Invest* **107**, 651-656.
- Postic, D., Korenberg, E., Gorelova, N., Kovalevski, Y.V., Bellenger, E., and Baranton, G.** (1997). *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. *Res Microbiol* **148**, 691-702.
- Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Henderson, M., and Baranton, G.** (1998). Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J Clin Microbiol* **36**, 3497-3504.
- Priem, S., Munkelt, K., Franz, J.K., Schneider, U., Werner, T., Burmester, G.R., and Krause, A.** (2003). Epidemiology and therapy of Lyme arthritis and other manifestations of Lyme borreliosis in Germany: results of a nation-wide survey. *Z Rheumatol* **62**, 450-458.
- Randolph, S.E., Gern, L., and Nuttall, P.A.** (1996). Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol Today* **12**, 472-479.

- Rathinavelu, S., Broadwater, A., and de Silva, A.M.** (2003). Does host complement kill *Borrelia burgdorferi* within ticks? *Infect Immun* **71**, 822-829.
- Rauter, C., and Hartung, T.** (2005). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies in *Ixodes ricinus* ticks in Europe: a metaanalysis. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7203-7216.
- Rauter, C., Oehme, R., Diterich, I., Engele, M., and Hartung, T.** (2002). Distribution of clinically relevant *Borrelia* genospecies in ticks assessed by a novel, single-run, real-time PCR. *J Clin Microbiol* **40**, 36-43.
- Reed, K.D., Meece, J.K., Henkel, J.S., and Shukla, S.K.** (2003). Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res* **1**, 5-12.
- Richter, D., Klug, B., Spielman, A., and Matuschka, F.R.** (2004). Adaptation of diverse Lyme disease spirochetes in a natural rodent reservoir host. *Infect Immun* **72**, 2442-2444.
- Richter, D., Spielman, A., Komar, N., and Matuschka, F.R.** (2000). Competence of American robins as reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. *Emerg Infect Dis* **6**, 133-138.
- Rijpkema, S.G., Tazelaar, D.J., Molkenboer, M.J., Noordhoek, G.T., Plantinga, G., Schouls, L.M., and Schellekens, J.F.** (1997). Detection of *Borrelia afzelii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* and group VS116 by PCR in skin biopsies of patients with erythema migrans and acrodermatitis chronica atrophicans. *Clin Microbiol Infect* **3**, 109-116.
- Robertson, J.N., Gray, J.S., and Stewart, P.** (2000). Tick bite and Lyme borreliosis risk at a recreational site in England. *Eur J Epidemiol* **16**, 647-652.
- Ruzic-Sabljić, E., Strle, F., Cimperman, J., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., and Pleterski-Rigler, D.** (2000). Characterisation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from patients with skin manifestations of Lyme borreliosis residing in Slovenia. *J Med Microbiol* **49**, 47-53.
- Ruzic-Sabljić, E., Arnez, M., Logar, M., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Cimperman, J., and Strle, F.** (2005). Comparison of *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains isolated from specimens obtained simultaneously from two different sites of infection in individual patients. *J Clin Microbiol* **43**, 2194-2200.
- Ryan, R.J., Apperson, C.S., Orndorff, P.E., and Levine, J.F.** (2000). Characterization of Lyme disease spirochetes isolated from ticks and vertebrates in north Carolina. *J Wildlife Disease* **36**, 48-55.
- Ryffel, K., Peter, O., Rutti, B., Suard, A., and Dayer, E.** (1999). Scored antibody reactivity determined by immunoblotting shows an association between clinical manifestations and presence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii*, and *B. valaisiana* in humans. *J Clin Microbiol* **37**, 4086-4092.
- Saint Girons, I., Gern, L., Gray, J.S., Guy, E.C., Korenberg, E., Nuttall, P.A., Rijpkema, S.G., Schonberg, A., Stanek, G., and Postic, D.** (1998). Identification of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in Europe. *Zentralbl Bakteriol* **287**, 190-195.
- Salyers, A.A., and Witt, D.** (2002). *Bacterial Pathogenesis, A Molecular Approach*. American Society for Microbiology, ed (Washington: ASM Press).
- Schaarschmidt, D., Oehme, R., Kimmig, P., Dieter Hesch, R.-D., and Englisch, S.** (2001). Detection and molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and in different patient samples from southwest Germany. *European Journal of Epidemiology* **17**, 1067-1074.
- Schmidt, B.L.** (1997). PCR in laboratory diagnosis of human *Borrelia burgdorferi* infections. *Clin Microbiol Rev* **10**, 185-201.
- Schneider, B.S., Zeidner, N.S., Burkot, G.O., Maupin, G.O., and Piesman, J.** (2000). *Borrelia* isolates in northern Colorado identified as *Borrelia bissettii*. *J Clin Microbiol* **38**, 3103-3105.
- Schulte-Spechtel, U., Fingerle, V., Goettner, G., Rogge, S., and Wilske, B.** (2006). Molecular analysis of decorin-binding protein A (DbpA) reveals five major groups among European *Borrelia*

burgdorferi sensu lato strains with impact for the development of serological assays and indicates lateral gene transfer of the *dbpA* gene. *Int J Med Microbiol* **296 Suppl 40**, 250-266.

Schwan, T.G. (2003). Temporal regulation of outer surface proteins of the Lyme-disease spirochaete *Borrelia burgdorferi*. *Biochem Soc Trans* **31**, 108-112.

Schwan, T.G., Piesman, J., Golde, W.T., Dolan, M.C., and Rosa, P.A. (1995). Induction of an outer surface protein on *Borrelia burgdorferi* during tick feeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 2909-2913.

Schwartz, I. (1997). Inhibition of efficient polymerase chain reaction amplification of *Borrelia burgdorferi* DNA in blood-fed ticks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **56**, 339-342.

Shanafelt, M.C., Anzola, J., Soderberg, C., Yssel, H., Turck, C.W., and Peltz, G. (1992). Epitopes on the outer surface protein A of *Borrelia burgdorferi* recognized by antibodies and T cells of patients with Lyme disease. *J Immunol* **148**, 218-224.

Sinski, E., Pawelczyk, A., Bajer, A., and Behnke, J. (2006). Abundance of wild rodents, ticks and environmental risk of Lyme borreliosis: a longitudinal study in an area of Mazury Lakes district of Poland. *Ann Agric Environ Med* **13**, 295-300.

Sonenshine, D. E., (1993) *Biology of ticks*. Vol 2. (Oxford: University Press).

Sparagano, O.A., Allsopp, M.T., Mank, R.A., Rijpkema, S.G., Figueroa, J.V., and Jongejan, F. (1999). Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: *Ixodidae*): a review. *Exp Appl Acarol* **23**, 929-960.

Spitalska, E., Literak, I., Sparagano, O.A., Golovchenko, M., and Kocianova, E. (2006). Ticks (*Ixodidae*) from passerine birds in the Carpathian region. *Wien Klin Wochenschr* **118**, 759-764.

Stanczak, J., Okroy-Rysop, G., Racewicz, M., Kubica-Biernat, B., and Kruminis-Lozowska, W. (2002). Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in the selected *Ixodes ricinus* (Acari: *Ixodidae*) population in Weilburg forests, Hesse, Germany. *Int J Med Microbiol* **291 Suppl 33**, 206-209.

Stanek, G., and Hofmann, H. (1994). *Krank durch Zecken, FSME und Lyme Borreliose*. (Wien: Verlag Wilhelm Maudrich).

Stapput, K. (2006). Dissertation, Verhaltensbiologische Untersuchungen zum chemischen Magnetkompass bei Rotkehlchen (*Erithacus rubecula*), *Fachbereich Biowissenschaften*, Johann-Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt.

Steere, A. C. (1989). Lyme disease. *N Eng J Med* **321**, 586-596.

Steil, B. (2002). Dissertation, Die genetische Heterogenität von *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ausgewählten Naturherden Deutschlands, *Lehrbereich für Lebensmittel- und Umwelthygiene*, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.

Stevenson, B., Bono, J.L., Schwan, T.G., and Rosa, P.A. (1998). *Borrelia burgdorferi* Erp proteins are immunogenic in mammals infected by tick bite, and their synthesis is inducible in cultured bacteria. *Infect Immun* **66**, 2648-2654.

Stevenson, B., Casjens, S., and Rosa, P. (1998). Evidence of past recombination events among genes encoding the Erp antigens of *Borrelia burgdorferi*. *Micobiology* **144**, 1869-1879.

Stevenson, B., El-Hage, N., Hines, M.A., Miller, J.C., and Babb, K. (2002). Differential binding of host complement inhibitor factor H by *Borrelia burgdorferi* Erp surface proteins: a possible mechanism underlying the expansive host range of Lyme disease spirochetes. *Infect Immun* **70**, 491-497.

Stevenson, B., Schwan, T.G., and Rosa, P.A. (1995). Temperature-related differential expression of antigens in the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **63**, 4535-4539.

- Stevenson, B., von Lackum, K., Riley, S.P., Cooley, A.E., Woodman, M.E., and Bykowski, T.** (2006). Evolving models of Lyme disease spirochete gene regulation. *Wien Klin Wochenschr* **118**, 643-652.
- Straubinger, R.K.** (2000). PCR-Based quantification of *Borrelia burgdorferi* organisms in canine tissues over a 500-Day postinfection period. *J Clin Microbiol* **38**, 2191-2199.
- Strle, F., Picken, R.N., Cheng, Y., Cimperman, J., Maraspin, V., Lotric-Furlan, S., Ruzic-Sabljic, E., and Picken, M.M.** (1997). Clinical findings for patients with Lyme borreliosis caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato with genotypic and phenotypic similarities to strain 25015. *Clin Infect Dis* **25**, 273-280.
- Sünder, U.** (2003). Dissertation. Zu Vorkommen und Verbreitung von *Borrelia burgdorferi* in ausgewählten Naturherdgebieten Thüringens unter besonderer Berücksichtigung des Hauptvektors *Ixodes ricinus* L. 1758, *Lehrbereich für Lebensmittel- und Umwelthygiene*, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Süss, J., Klaus, C., Diller, R., Schrader, C., Wohanka, N., and Abel, U.** (2006). TBE incidence versus virus prevalence and increased prevalence of the TBE virus in *Ixodes ricinus* removed from humans. *Int J Med Microbiol* **296 Suppl 40**, 63-68.
- Swanson, S.J., Neitzel, D., Reed, K.D., and Belongia, E.A.** (2006). Coinfections acquired from *ixodes* ticks. *Clin Microbiol Rev* **19**, 708-727.
- Talleklint, L., Jaenson, T.G., and Mather, T.N.** (1993). Seasonal variation in the capacity of the bank vole to infect larval ticks (Acari: *Ixodidae*) with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Med Entomol* **30**, 812-815.
- Tälleklint, L., and Jaenson, T.G.** (1994). Transmission of *Borrelia burgdorferi* s. l. from mammal reservoirs to the primary vector of Lyme borreliosis, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in Sweden. *J Med Entomol* **31**, 880-886.
- Tälleklint, L., and Jaenson, T.G.** (1996). Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with *Borrelia*-like spirochetes and density of infected ticks. *J Med Entomol* **33**, 805-811.
- Thanassi, W.T., and Schoen, R.T.** (2000). The Lyme disease vaccine: conception, development, and implementation. *Ann Intern Med* **132**, 661-668.
- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Mather, T.N., and Ribeiro, J.M.C.** (2000). Purification, cloning and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis* nymphs. *J Infect Dis* **183**, 773-778.
- van Dam, A.P.** (2002). Diversity of Ixodes-borne *Borrelia* species: clinical, pathogenetic, and diagnostic implications and impact on vaccine development. *Vector Borne Zoonotic Dis* **2**, 249-254.
- van Dam, A.P., Kuiper, H., Vos, K., Widjojokusumo, A., de Jongh, B.M., Spanjaard, L., Ramselaar, A.C., Kramer, M.D., and Dankert, J.** (1993). Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. *Clin Infect Dis* **17**, 708-717.
- van Dam, A.P., Oei, A., Jaspars, R., Fijen, C., Wilske, B., Spanjaard, L., and Dankert, J.** (1997). Complement-mediated serum sensitivity among spirochetes that cause Lyme disease. *Infect Immun* **65**, 1228-1230.
- Vasiliu, V., Herzer, P., Rossler, D., Lehnert, G., and Wilske, B.** (1998). Heterogeneity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato demonstrated by an ospA-type-specific PCR in synovial fluid from patients with Lyme arthritis. *Med Microbiol Immunol* **187**, 97-102.
- von Lackum, K., Miller, J.C., Bykowski, T., Riley, S.P., Woodman, M.E., Brade, V., Kraiczy, P., Stevenson, B., and Wallich, R.** (2005). *Borrelia burgdorferi* regulates expression of complement regulator-acquiring surface protein 1 during the mammal-tick infection cycle. *Infect Immun* **73**, 7398-7405.

- Wang, G., van Dam, A.P., Le Fleche, A., Postic, D., Peter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., and Dankert, J. (1997). Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int J Syst Bacteriol* **47**, 926-932.
- Wang, G., van Dam, A.P., and Dankert, J. (1999a). Phenotypic and genetic characterization of a novel *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate from a patient with lyme borreliosis. *J Clin Microbiol* **37**, 3025-3028.
- Wang, G., van Dam, A.P., Schwartz, I., and Dankert, J. (1999b). Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* **12**, 633-653.
- Wang, G., van Dam, A.P., and Dankert, J. (2000). Two distinct ospA genes among *Borrelia valaisiana* strains. *Res Microbiol* **151**, 325-331.
- Wang, G., Liveris, D., Brei, B., Wu, H., Falco, R.C., Fish, D., and Schwartz, I. (2003). Real-time PCR for simultaneous detection and quantification of *Borrelia burgdorferi* in field-collected *Ixodes scapularis* ticks from the Northeastern United States. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4561-4565.
- Wielinga, P.R., Gaasenbeek, C., Fonville, M., de Boer, A., de Vries, A., Dimmers, W., Akkerhuis Op Jagers, G., Schouls, L.M., Borgsteede, F., and van der Giessen, J.W. (2006). Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* **72**, 7594-7601.
- Wikel, S.K. (1999). Tick modulation of host immunity: an important factor in pathogen transmission. *Int J Parasitol* **29**, 851-859.
- Will, G., Jauris-Heipke, S., Schwab, E., Busch, U., Rossler, D., Soutschek, E., Wilske, B., and Preac-Mursic, V. (1995). Sequence analysis of ospA genes shows homogeneity within *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* strains but reveals major subgroups within the *Borrelia garinii* species. *Med Microbiol Immunol* **184**, 73-80.
- Wilske, B., Steinhuber, R., Bergmeister, H., Fingerle, V., Schierz, G., Preac Mursic, V., Vanek, E., and Lorbeer, B. (1987). Lyme-Borreliose in Süddeutschland. *Dtsch Med Wochenschr* **118**, 197-203.
- Wilske, B., Preac-Mursic, V., Gobel, U.B., Graf, B., Jauris, S., Soutschek, E., Schwab, E., and Zumstein, G. (1993). An OspA serotyping system for *Borrelia burgdorferi* based on reactivity with monoclonal antibodies and OspA sequence analysis. *J Clin Microbiol* **31**, 340-350.
- Wilske, B., Busch, U., Eiffert, H., Fingerle, V., Pfister, H.W., Rossler, D., and Preac-Mursic, V. (1996a). Diversity of OspA and OspC among cerebrospinal fluid isolates of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from patients with neuroborreliosis in Germany. *Med Microbiol Immunol* **184**, 195-201.
- Wilske, B., Busch, U., Fingerle, V., Jauris-Heipke, S., Preac Mursic, V., Rossler, D., and Will, G. (1996b). Immunological and molecular variability of OspA and OspC. Implications for *Borrelia* vaccine development. *Infection* **24**, 208-212.
- Wilske, B., and Fingerle, V. (1996c). Ehrlichiose. *Münch med Wschr* **12**, 202-204.
- Wilske, B. (2002). Microbiological diagnosis in Lyme borreliosis. *Int J Med Microbiol* **291**, 114-119.
- Wright, S.A., Lemenager, D.A., Tucker, J.R., Armijos, M.V., and Yamamoto, S.A. (2006). An avian contribution to the presence of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) and *Borrelia burgdorferi* on the sutter buttes of California. *J Med Entomol* **43**, 368-374.
- Xu, Y., Kodner, C., Coleman, L., and Johnson, R.C. (1996). Correlation of plasmids with infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto type strain B31. *Infect Immun* **64**, 3870-3876.
- Younsi, H., Sarih, M., Jouda, F., Godfroid, E., Gern, L., Bouattour, A., Baranton, G., and Postic, D. (2005). Characterization of *Borrelia lusitaniae* isolates collected in Tunisia and Morocco. *J Clin Microbiol* **43**, 1587-1593.

Zhioua, E., Postic, D., Rodhain, F., and Perez-Eid, C. (1996). Infection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) by *Borrelia burgdorferi* in Ile de France. J Med Entomol **33**, 694-697.

Zeman, P., and Daniel, M. (1999). Mosaic pattern of *Borrelia* infections in a continuous population of the tick *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). Exp Appl Acarol **23**, 327-335.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Dorn für das zur Verfügung gestellte Thema, die wissenschaftliche Betreuung sowie für die Unterstützung bei der Abfassung des Manuskripts.

Bei Frau C. Flügel möchte ich mich für die immer wieder motivierende Zusammenarbeit im Labor und die vielen Zecken- und Mäusefangausflüge bedanken. Ohne die hervorragende seelische und materielle Verpflegung hätte ich das Öfteren meinen Optimismus verloren.

Herrn Dr. V. Fingerle danke ich für die Möglichkeit eines Arbeitsaufenthaltes im Referenzzentrum für Borrelien des Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München und seine Ratschläge bei der Bearbeitung des Themas.

Frau C. Hitzo-Teufel danke ich für die gute Einarbeitung in die PCR-RFLP und die Durchführung der Sequenzierungen.

Jan Franke und Sybille Kaage danke ich für die gute Zusammenarbeit während der Anfertigung der Diplomarbeiten und Jan Franke danke ich besonders für das Korrekturlesen der Arbeit und für anregende Diskussionen.

Bei Andreas Goedecke und Joachim Blank möchte ich mich für das Absammeln der Zecken während der Vogelberingung und für die hilfreichen Diskussionen zum Thema bedanken.

Dem Gesundheitsamt Erfurt danke ich für die Bereitstellung fachlicher Daten.

Frau Prof. Dr. B. Pool-Zobel danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Geldokumentationssystems.

Auch bei allen an der Untersuchung teilnehmenden Ärzten, die die abgesammelten Zecken bereitstellten, möchte ich mich bedanken sowie bei allen fleißigen Zeckensammlern, die ab und zu mit uns durch die Wiesen streiften.

Mein Dank gilt der Friedrich-Schiller-Universität Jena für die Finanzierung meiner Stelle und dem Thüringer Ministerium für Familie, Soziales und Gesundheit, für die finanzielle Unterstützung bei der Untersuchung der Zecken Thüringens.

Das größte Dankeschön geht an meine Familie, die mir diesen Weg ermöglicht und mich immer unterstützt hat. Ralf danke ich für das fleißige Zeckensammeln und die viele Geduld und meinen Kindern Ole und Lotta für die immer dankend angenommene Ablenkung beim Schreiben der Arbeit.

IM RAHMEN DIESER ARBEIT ENTSTANDENE PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

Poster und Abstracts

Kipp, S., Dorn, W., Wilske, B., Fingerle, V. (2005) Heterogeneity in prevalence and genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in different localities in Thuringia, Germany. VIII International Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases, Jena.

Kipp, S., Goedecke, A., Dorn, W., Wilske, B., Fingerle, V. (2005) Role of birds in Thuringia, Germany, in the natural cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete. VIII International Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases, Jena.

Franke, J., Kipp, S., Steil, B., Sünder, U., Fingerle, V., Flügel, C., Dorn, W. (2007) Seasonal patterns in the occurrence of *Borrelia burgdorferi* s. l. in free living ticks in Thuringia (Germany) determined by two different methods. XI International Conference on Lyme Borreliosis and other tick-borne diseases, Wien.

Publikationen

Kipp, S., Dorn, W., Wilske, B., Fingerle, V. (2006) Heterogeneity in prevalence and genetic diversity of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in different localities in Thuringia, Germany. *Int J Med Microbiol* 296, 119-121.

Kipp, S., Goedecke, A., Dorn, W., Wilske, B., Fingerle, V. (2006) Role of birds in Thuringia, Germany, in the natural cycle of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the Lyme disease spirochaete. *Int J Med Microbiol* 296, 122-124.

Franke, J., Kipp, S., Flügel, C., Dorn, W. (2008) Prevalence of *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks feeding on humans in Thuringia, Germany. *Int J Med Microbiol* (eingereicht).

Vorträge

Kipp, S., Dorn, W. (2004) Prävalenz von *Borrelia burgdorferi* s. l. im Freistaat Thüringen. 7. Kolloquium Aktuelle Fragen zu FSME und Borreliose, Erfurt.

LEBENS LAUF

Name: Susanne Kipp
 Geboren: 07.07.1971
 Familienstand: ledig, zwei Kinder
 Anschrift: An der Auenschanze 7, 99089 Erfurt

Schul Ausbildung

1978-1988 POS in Ilmenau
 1988-1990 EOS in Ilmenau
 15. Juni 1990 Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr

1990-1991 im Kreiskrankenhaus Ilmenau

Studium

1991-1992 Chemie-Studium an der TH Darmstadt, Studienplatzwechsel
 1991-1998 Biologie-Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
 18.5.1998 Abschluss als Diplom-Biologin

Postgraduale Ausbildung

1998-1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Lebensmittel- und
 und Umwelthygiene (Prof. Dr. med. vet. W. Dorn), Institut für
 2001-2005 Ernährungswissenschaften der FSU Jena

 1999-2000 Erziehungsurlaub
 2005-2007 Erziehungsurlaub

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Arbeit nicht beteiligt.

Ich habe für diese Arbeit keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form bei keiner anderen Prüfungsbehörde weder im In- noch Ausland vorgelegt.

Ich erkläre hiermit, dass mir die Promotionsordnung der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ich versichere, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Erfurt, April 2008